

TENT COOPERATION TRE

PCT

## **NOTIFICATION OF ELECTION**

(PCT Rule 61.2)

<b>Date of mailing</b> (day/month/year)	29 November 1999 (29.11.99)
<b>International application No.</b>	PCT/EP99/03469
<b>International filing date</b> (day/month/year)	20 May 1999 (20.05.99)
<b>Applicant</b>	HAUER, Bernhard et al

## From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Assistant Commissioner for Patents  
United States Patent and Trademark  
Office  
Box PCT  
Washington, D.C.20231  
ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE

in its capacity as elected Office

**Applicant's or agent's file reference**  
0050/049041

**Priority date (day/month/year)**  
20 May 1998 (20.05.98)

1. The designated Office is hereby notified of its election result.

in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

06 November 1999 (06.11.99)

in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election  was

was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

<p><b>The International Bureau of WIPO</b>  <b>34, chemin des Colombettes</b>  <b>1211 Geneva 20, Switzerland</b></p> <p>Facsimile No.: (41-22) 740.14.35</p>	<p><b>Authorized officer</b></p> <p>A. Karkachi</p> <p>Telephone No.: (41-22) 338.83.38</p>
<p>Form PCT/IB/331 (July 1992)</p>	

M.H

T 16

# VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

REC'D 18 FEB 2000

## INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts  0050/049041	<b>WEITERES VORGEHEN</b>	siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsbericht (Formblatt PCT/IPEA/416)
Internationales Aktenzeichen  PCT/EP99/03469	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr)  20/05/1999	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag)  20/05/1998
Internationale Patentklassification (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK  C12N15/55		
Anmelder  BASF AKTIENGESELLSCHAFT et al.		

<ol style="list-style-type: none"><li>1. Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationale vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.</li><li>2. Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 5 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.  <input type="checkbox"/> Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).  Diese Anlagen umfassen insgesamt Blätter.</li><li>3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:  <ul style="list-style-type: none"><li>I    <input checked="" type="checkbox"/> Grundlage des Berichts</li><li>II   <input type="checkbox"/> Priorität</li><li>III   <input checked="" type="checkbox"/> Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erforderliche Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit</li><li>IV   <input type="checkbox"/> Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung</li><li>V   <input checked="" type="checkbox"/> Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erforderliche Tätigkeit und der gewerbliche Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung</li><li>VI   <input type="checkbox"/> Bestimmte angeführte Unterlagen</li><li>VII   <input type="checkbox"/> Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung</li><li>VIII   <input checked="" type="checkbox"/> Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung</li></ul></li></ol>	
---	--

Datum der Einreichung des Antrags  06/11/1999	Datum der Fertigstellung dieses Berichts  14.02.00
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:  Europäisches Patentamt	Bevollmächtigter Bediensteter



**INTERNATIONALER VORLÄUFIGER  
PRÜFUNGSBERICHT**

Internationales Aktenzeichen PCT/EP99/03469

**I. Grundlage des Berichts**

1. Dieser Bericht wurde erstellt auf der Grundlage (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigefügt, weil sie keine Änderungen enthalten.*):

**Beschreibung, Seiten:**

1-21                    ursprüngliche Fassung

**Patentansprüche, Nr.:**

1-18                    ursprüngliche Fassung

**Zeichnungen, Blätter:**

1/2-2/2                ursprüngliche Fassung

2. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

Beschreibung,        Seiten:  
 Ansprüche,           Nr.:  
 Zeichnungen,          Blatt:

3.  Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)):

4. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

**III. Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit**

Folgende Teile der Anmeldung wurden nicht daraufhin geprüft, ob die beanspruchte Erfindung als neu, auf erfinderischer Tätigkeit beruhend (nicht offensichtlich) und gewerblich anwendbar anzusehen ist:

- die gesamte internationale Anmeldung.  
 Ansprüche Nr. 1-4, 7-14 teilweise, 17-18 teilweise .

Begründung:

# INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP99/03469

- Die gesamte internationale Anmeldung, bzw. die obengenannten Ansprüche Nr. beziehen sich auf den nachstehenden Gegenstand, für den keine internationale vorläufige Prüfung durchgeführt werden braucht (*genaue Angaben*):
- Die Beschreibung, die Ansprüche oder die Zeichnungen (*machen Sie hierzu nachstehend genaue Angaben*) oder die obengenannten Ansprüche Nr. sind so unklar, daß kein sinnvolles Gutachten erstellt werden konnte (*genaue Angaben*):
- Die Ansprüche bzw. die obengenannten Ansprüche Nr. sind so unzureichend durch die Beschreibung gestützt, daß kein sinnvolles Gutachten erstellt werden konnte.
- Für die obengenannten Ansprüche Nr. 1-4 wurde kein internationaler Recherchenbericht erstellt.

## V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

### 1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche 5, 6, 15, 16, 7-14 teilweise, 17-18 teilweise Nein: Ansprüche
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche 5, 6, 15, 16, 7-14 teilweise, 17-18 teilweise Nein: Ansprüche
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche 5, 6, 15, 16, 7-14 teilweise, 17-18 teilweise Nein: Ansprüche

### 2. Unterlagen und Erklärungen

siehe Beiblatt

## VIII. Bestimmte Bemerkung zur internationalen Anmeldung

Zur Klarheit der Patentansprüche, der Beschreibung und der Zeichnungen oder zu der Frage, ob die Ansprüche in vollem Umfang durch die Beschreibung gestützt werden, ist folgendes zu bemerken:

siehe Beiblatt

- 1). Die vorliegende Anmeldung betrifft Peptidfragmente, die sich von der Metallbindungsstelle der Helicobacter pylori ATPase-439 ableiten, sowie die Verwendung dieser Peptidfragmente in Fusionsproteinen.
- 2). Der internationale Recherchenbericht wurde nur für die Ansprüche 5-18 durchgeführt soweit sich die Ansprüche 7-18 auf die Peptidfragmente der Ansprüche 5 und 6 beziehen.
- 3). Neuheit

Keines der im internationalen Recherchenbericht aufgeführten Dokumente offenbart die Peptidfragmente der Ansprüche 5 und 6. Daher scheint der Gegenstand dieser Ansprüche neu zu sein.

Der Gegenstand der Ansprüche 7-14, 17 und 18 kann nur in so weit geprüft werden wie er sich nicht auf den Gegenstand der Ansprüche 1-4 bezieht.

Da die Peptidfragmente der Ansprüche 5 und 6 neu sind scheint auch der Gegenstand der Ansprüche 7-14, 17 und 18, soweit er sich auf die Ansprüche 5 und 6 bezieht, neu zu sein.

Das Verfahren des unabhängigen Anspruchs 15 und des davon abhängigen Anspruchs 16, mit der Einschränkung auf eine um mindestens 1,5 fach stärkere reversible Bindung, wird im Stand des Technik (internationaler Recherchenbericht) nicht offenbart und ist daher als neu anzusehen.

- 4). Erfinderischer Schritt

Die Helicobacter pylori ATPase-439 ist aus D1 ( VOLZ J ET AL: 'Molecular characterization of metal -binding polypeptide domains by electrospray ionization mass spectrometry and metal chelate affinity chromatography.' JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY. A, (1998 MAR 20) 800 (1) 29-37) bekannt.

Das zugrunde liegende Problem der vorliegenden Anmeldung, d.h. die Bereitstellung von synthetischen Peptiden, die eine stärkere Metallbindungsaffinität als die natürliche metallbindende Domäne der ATPase-439 aufweisen und die Verwendung dieser Peptide in Fusionsproteinen zu deren Reinigung, wird in den Dokumenten des internationalen Recherchenberichts weder angesprochen noch wird die Lösung dieses Problems nahegelegt. Daher

**INTERNATIONALER VORLÄUFIGER  
PRÜFUNGSBERICHT - BEIBLATT**

Internationales Aktenzeichen PCT/EP99/03469

basieren die Peptidfragmente der Ansprüche 5 und 6, das Verfahren der Ansprüche 15 und 16 und der Gegenstand der Ansprüche 7-14, 17 und 18, soweit er sich auf die Ansprüche 5 und 6 bezieht, auf einem erfinderischen Schritt.

**5). Klarheit**

Der Anspruch 15 ist insofern unklar, als er die Variablen X<sup>1</sup> bis X<sup>6</sup> nicht definiert. Unter X<sup>1</sup> bis X<sup>6</sup> können daher sowohl die Variablen der Ansprüche 1-6 als auch alle 20 Aminosäuren verstanden werden. Das bedeutet, daß die Reichweite des Schutzes nicht klar definiert ist (Art. 6 PCT).

09/674962  
Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference  0050/049041	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No.  PCT/EP99/03469	International filing date (day/month/year)  20 May 1999 (20.05.99)	Priority date (day/month/year)  20 May 1998 (20.05.98)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC  C12N 15/55		
		RECEIVED  MAR 15 2001
Applicant  BASF AKTIENGESELLSCHAFT	TECH CENTER 1600/2900	

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of <u>5</u> sheets, including this cover sheet.
<input checked="" type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).  These annexes consist of a total of _____ sheets.
3. This report contains indications relating to the following items:
I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report
II <input type="checkbox"/> Priority
III <input checked="" type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention
V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited
VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application
VIII <input checked="" type="checkbox"/> Certain observations on the international application

Date of submission of the demand  06 November 1999 (06.11.99)	Date of completion of this report  14 February 2000 (14.02.2000)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

**INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT**

International application No.

PCT/EP99/03469

**I. Basis of the report**

1. This report has been drawn on the basis of (*Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.*):

 the international application as originally filed. the description, pages 1-21, as originally filed,

pages \_\_\_\_\_, filed with the demand,

pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_,

pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.

 the claims, Nos. 1-18, as originally filed,

Nos. \_\_\_\_\_, as amended under Article 19,

Nos. \_\_\_\_\_, filed with the demand,

Nos. \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_,

Nos. \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.

 the drawings, sheets/fig 1/2-2/2, as originally filed,

sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the demand,

sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_,

sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

 the description, pages \_\_\_\_\_ the claims, Nos. \_\_\_\_\_ the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_

3.  This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:

International application No.

PCT/EP99/03469

**INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT**

**III. Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability**

The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

- the entire international application.
- claims Nos. 1-4, 7-14 17-18

because:

- the said international application, or the said claims Nos. \_\_\_\_\_ relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (*specify*):

- the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. \_\_\_\_\_ are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP 99/03469

**V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement****1. Statement**

Novelty (N)	Claims	5, 6, 15, 16, 7 - 14 in part, 17 and 18 in part	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	5, 6, 15, 16, 7 - 14 in part, 17 and 18 in part	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	5, 6, 15, 16, 7 - 14 in part, 17 and 18 in part	YES
	Claims		NO

**2. Citations and explanations**

- 1). The present application pertains to peptide fragments which are derived from the metal-binding site of *Helicobacter pylori* ATPase-439 and to the use of said peptide fragments in fusion proteins.
- 2). The international search report was carried out only for Claims 5 - 18 in so far as Claims 7 - 18 refer to the peptide fragments of Claims 5 and 6.
- 3). Novelty

None of the documents cited in the international search report discloses the peptide fragments of Claims 5 and 6. The subjects of said claims therefore appear to be novel.

The subjects of Claims 7 - 14, 17 and 18 can be examined only in so far as said subjects do not refer to the subjects of Claims 1 - 4.

Since the peptide fragments of Claims 5 and 6 are novel, the subjects of Claims 7 - 14, 17 and 18, in so far as said subjects refer to Claims 5 and 6, also appear to be novel.

(Continuation of V.2)

The method of independent Claim 15 and of its dependent Claim 16, restricted to an at least 1.5 times stronger reversible binding, is not disclosed in the prior art (of the international search report) and is therefore considered to be novel.

4). Inventive step

*Helicobacter pylori ATPase-439* is known from D1 (VOLZ J ET AL: 'Molecular characterization of metal-binding polypeptide domains by electrospray ionization mass spectrometry and metal chelate affinity chromatography.' JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY. A. (1998 MAR 20) 800 (1) 29 - 37. The problem addressed by the present application, that is, the preparation of synthetic peptides which have a stronger metal-binding affinity than the natural metal-binding domain of ATPase-439 and the use of these peptides in fusion proteins to purify them, is not addressed in the international search report documents nor is the solution to said problem suggested. Consequently, the peptide fragments of Claims 5 and 6, the method of Claims 15 and 16 and the subjects of Claims 7 - 14, 17 and 18, in so far as they refer to Claims 5 and 6, involve an inventive step.

**INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT**

International application No.

PCT/EP 99/03469

**VIII. Certain observations on the international application**

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

**5). Clarity**

Claim 15 is unclear, because it does not define the variables  $X^1$  to  $X^6$ . Consequently,  $X^1$  to  $X^6$  can be interpreted to mean the variables of Claims 1 - 6 as well as all 20 amino acids. This means that the scope of protection is not clearly defined (PCT Article 6).

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM

Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 6 : <b>C12N 15/55, 15/62, C07K 1/22, G01N 33/53</b>		A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: <b>WO 99/60134</b> (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: <b>25. November 1999 (25.11.99)</b>
(21) Internationales Aktenzeichen: <b>PCT/EP99/03469</b>			(81) Bestimmungsstaaten: AL, AU, BG, BR, BY, CA, CN, CZ, GE, HU, ID, IL, IN, JP, KR, KZ, LT, LV, MK, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SG, SI, SK, TR, UA, US, ZA, eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).
(22) Internationales Anmeldedatum: <b>20. Mai 1999 (20.05.99)</b>			
(30) Prioritätsdaten: 198 22 823.6      20. Mai 1998 (20.05.98)      DE			
(71) Anmelder ( <i>für alle Bestimmungsstaaten ausser US</i> ): <b>BASF AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; D-67056 Ludwigshafen (DE).</b>			<b>Veröffentlicht</b> <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i> <i>Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>
(72) Erfinder; und			
(75) Erfinder/Anmelder ( <i>nur für US</i> ): <b>HAUER, Bernhard [DE/DE]; Merowingerstrasse 1, D-67136 Fußgönheim (DE). SCHMID, Rolf, D. [DE/DE]; Allmandring 31, D-70569 Stuttgart (DE). ENZELBERGER, Markus [DE/DE]; Allmandring 31, D-70569 Stuttgart (DE). MINNING, Stephan [DE/DE]; Allmandring 31, D-70569 Stuttgart (DE).</b>			
(74) Gemeinsamer Vertreter: <b>BASF AKTIENGESELLSCHAFT; D-67056 Ludwigshafen (DE).</b>			

(54) Title: NEW PEPTIDE FRAGMENTS FOR PROTEIN PURIFICATION

(54) Bezeichnung: NEUE PEPTIDFRAGMENTE ZUR REINIGUNG VON PROTEINEN

(57) Abstract

The invention relates to new peptide fragments, fusion proteins containing said peptide fragments, methods for producing same and the use of the peptide fragments. The invention also relates to a method for the purification of fusion proteins and a method for detecting proteins. The invention further relates to nucleic acids coding for the peptide fragments or the fusion proteins and to vectors containing said nucleic acids.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft neue Peptidfragmente, Fusionsproteine enthaltend die Peptidfragmente, Verfahren zu ihrer Herstellung sowie die Verwendung der Peptidfragmente. Die Erfindung betrifft auch ein Verfahren zur Reinigung der Fusionsproteine und ein Verfahren zur Detektion von Proteinen. Weiterhin betrifft die Erfindung Nukleinsäuren, die für die Peptidfragmente oder für die Fusionsproteine kodieren und Vektoren, die die Nukleinsäuren enthalten.

**LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Neue Peptidfragmente zur Reinigung von Proteinen

Beschreibung

5

Die Erfindung betrifft neue Peptidfragmente, Fusionsproteine enthaltend die Peptidfragmente, Verfahren zur ihrer Herstellung sowie die Verwendung der Peptidfragmente. Die Erfindung betrifft auch ein Verfahren zur Reinigung der Fusionsproteine und ein

10 Verfahren zur Detektion von Proteinen.

Weiterhin betrifft die Erfindung Nukleinsäuren, die für die Peptidfragmente oder für die Fusionsproteine kodieren und Vektoren, die die Nukleinsäuren enthalten.

15

Durch die moderne Molekularbiologie ist es möglich geworden fast beliebige Proteine, Peptide oder deren Derivate in nahezu unbegrenzten Mengen herzustellen. Die Proteinreinigung erweist sich dabei häufig als der limitierende und nicht selten ineffiziente

20

und damit letztlich kostenbestimmende Faktor.

25

Es wurden deshalb eine Reihe von Techniken zur Reinigung von Proteinen entwickelt. Für die Reinigung von Proteinen aus Zellüberständen, Zellrohextrakten oder Zellen werden üblicherweise Techniken wie Salzpräzipitation oder Präzipitation mit organischen Lösungsmitteln, Ultrafiltration, Dialyse, Gelelektrophorese, Isoelektrische Fokusierung, Chromatofokusierung, Ionenaustauscher- oder Gelchromatographie, Hydrophobe Chromatographie, Immunopräzipitation oder IMAC (= Immobilized Metal Affinity Chromatographie) verwendet. Es können einzelne Methoden zur

30

Reinigung verwendet werden, in der Regel ist aber eine Kombination verschiedener Techniken erforderlich. Eine Übersicht über übliche Reinigungsmethoden ist beispielsweise den Lehrbüchern Protein Purification Process Engineering (Ed. R.G. Harrison, 1994, Marcel Dekker, Inc., New York, page 209 - 316, ISBN

35

0-8247-9009-X), Protein Purification (Ed. R.K. Scopes, 1994, Springer Verlag New York, chapter 4 - 7, ISBN 0-387-94072-3) und Methods for Protein Analysis (Ed. R.A. Copeland, 1994 Chapman & Hall, page 59 - 112, ISBN 0-412-03741-6) zu entnehmen. Für die Proteinreinigung ist es wichtig, daß die Reinigung so schonend

40

wie möglich, so selektiv wie möglich und möglichst rasch erfolgt. Dabei sollen die Proteinverluste so gering wie irgend möglich gehalten werden. Viele der Proteinreinigungsmethoden sind nicht ausreichend selektiv, für nur geringe Proteinmengen geeignet und/oder sehr teuer.

45

Die von Porath et al. (Nature, Vol. 258, 1975: 598 - 599) beschriebene Methode zur Proteinreinigung mit Hilfe der IMAC (= Immobilized Metal Affinity Chromatographie) ist ein guter Kompromiss zwischen den genannten Anforderungen an eine optimale Reinigung. Diese Methode hat jedoch noch einige Nachteile. So binden beispielsweise nicht alle Metallionen gleich gut an das Trägermaterial, so daß die Ionen zum Teil ausgewaschen werden und so das Wertprodukt verunreinigen. Viele Proteine binden gar nicht an das Chromatographiematerial und lassen sich so nicht reinigen oder binden zu schwach, so daß sie bei den erforderlichen Waschschritten des Säulenmaterials schon eluiert werden. Dies führt zu unerwünschten Produktverlusten. Da die Selektivität in der Regel für eine "Ein-Schritt-Reinigung" nicht ausreichend ist, im Gegensatz zur Reinigung über biospezifische Affinitätsreinigungsmethoden wie beispielsweise eine Reinigung über Antikörper, sind weitere Reinigungsschritte erforderlich.

Um eine breitere Palette an Proteinen mit dieser Methode reinigen zu können, wurde verschiedene sogenannte Tags wie Polyhistidin, His-Trp, His-Tyr oder (His-Asp)<sub>n</sub> entwickelt (siehe Sporeno et al., J. Biol. Chem. 269 (15), 1994: 10991 - 10995, Le Grice et al., Eur. J. Biochem., 187 (2), 1990: 307 - 314, Reece et al., Gene, 126 (1), 1993: 105 - 107, De Vos et al., Nucl. Acid. Res., 22 (7), 1994: 1161 - 1166, Feng et al., J. Biol. Chem. 269 (3), 1994: 2342 - 2348, Hochuli et al., Biotechnology, 1988: 1321 - 1325, Patwardhan et al., J. Chromatography A, 787, 1997: 91 - 100, Hutchens et al., J. Chromatography, 604, 1992: 133 - 141). Diese Tags werden mit den zu reinigenden Protein mit Hilfe der Molekularbiologie auf Nukleinsäureebene verbunden. Durch diese Tags konnte die Proteinreinigung in einigen Bereichen weiter verbessert werden. Jedoch auch diese Methode hat nach wie vor einige Nachteile. Nach wie vor läßt sich nicht sicher Vorhersagen, ob ein Protein über diese Methode aufgereinigt werden kann (siehe Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography, L. Kågedal, page 227 - 251 in Protein Purification, Eds. J.C. Janson, L. Rydén, 1989, VCH Publishers, Inc., New York, ISBN 0-89573-122-3), das heißt auch diese Methode ist nicht auf jedes Protein anwendbar. Auch hier können Metallionen ausgewaschen werden oder Proteine so schwach binden, daß sie während der Waschschrifte zum Teil verloren gehen. Auch die Selektivität läßt noch zu wünschen übrig. Außerdem ist die Beladungskapazität des Säulenmaterials mit den zu reinigenden Proteinen teilweise noch zu gering, so daß für eine Reinigung viel Säulenmaterial verwendet werden muß. Auch die Proteinausbeute ist noch nicht ausreichend. Dies führt zu unnötigen Kosten.

Von Volz et al. wurde die Reinigung zweier ATPasen von Helicobacter pylori ohne die Verwendung einer zusätzlichen His-Tag-Sequenz beschrieben. Diese ATPasen enthalten natürliche Metall-bindungsstellen, die eine Reinigung über IMAC ermöglichen. Eigene 5 Arbeiten zeigten, daß diese Bindungsstellen für eine effiziente Aufreinigung beliebiger Proteine eine zu geringe Bindungs-affinität aufweisen.

Es bestand daher die Aufgabe weitere Tags für die Protein-reinigung mittels IMAC zur Verfügung zu stellen, die die oben 10 genannten Nachteile nicht besitzen und dadurch beispielsweise eine breitere Anwendung der Tags und/oder eine höhere Beladungs-dichte des Säulenmaterials ermöglichen. Die eine höhere Selektivität zeigen und so die Reinigung vereinfachen.

15 Die Aufgabe wurde durch die erfindungsgemäßen Peptidfragmente mit der allgemeinen Sequenz

His-X<sup>1</sup>-His-X<sup>2</sup>-X<sup>3</sup>-X<sup>4</sup>-Cys-X<sup>5</sup>-X<sup>6</sup>-Cys gelöst,

20 wobei die Variablen X<sup>1</sup> bis X<sup>6</sup> in der Sequenz die folgende Bedeutung haben:

X<sup>1</sup> = eine Aminosäure ausgewählt aus der Gruppe Ala, Val, Phe, Ser, 25 Met, Trp, Tyr, Asn, Asp oder Lys und die Variablen X<sup>2</sup> bis X<sup>6</sup> eine Aminosäure ausgewählt aus der Gruppe Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Phe, Pro, Ser, Thr, Cys, Met, Trp, Tyr, Asn, Gln, Asp, Glu, Lys, Arg, His oder

30 X<sup>2</sup> = eine Aminosäure ausgewählt aus der Gruppe Val, Ile, Phe, Pro, Trp, Tyr, Gln, Glu oder Arg und die Variablen X<sup>1</sup>, X<sup>3</sup> bis X<sup>6</sup> eine Aminosäure ausgewählt aus der Gruppe Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Phe, Pro, Ser, Thr, Cys, Met, Trp, Tyr, Asn, Gln, Asp, Glu, Lys, Arg, His oder

35 X<sup>3</sup> = eine Aminosäure ausgewählt aus der Gruppe Gly, Ile, Thr, Met, Trp, Tyr, Asn, Gln, Asp, Glu, Lys, Arg, His und die Variablen X<sup>1</sup>, X<sup>2</sup>, X<sup>4</sup> bis X<sup>6</sup> eine Aminosäure ausgewählt aus der Gruppe Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Phe, Pro, Ser, Thr, Cys, Met, Trp, Tyr, Asn, Gln, Asp, Glu, Lys, Arg, His oder

40 X<sup>4</sup> = eine Aminosäure ausgewählt aus der Gruppe Val, Phe, Pro, Cys, Met, Trp, Asn, Glu, Arg oder His und die Variablen X<sup>1</sup> bis X<sup>3</sup>, X<sup>5</sup>, X<sup>6</sup> eine Aminosäure ausgewählt aus der Gruppe Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Phe, Pro, Ser, Thr, Cys, Met, Trp, Tyr, Asn, Gln, Asp, Glu, Lys, Arg, His oder

X<sup>5</sup> = eine Aminosäure ausgewählt aus der Gruppe Gly, Ser, Cys, Met, Trp, Asn, Glu, Lys oder Arg und die Variablen X<sup>1</sup> bis X<sup>4</sup>, X<sup>6</sup>  
eine Aminosäure ausgewählt aus der Gruppe Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Phe, Pro, Ser, Thr, Cys, Met, Trp, Tyr, Asn, Gln, Asp,  
5 Glu, Lys, Arg, His oder

X<sup>6</sup> = eine Aminosäure ausgewählt aus der Gruppe Phe, Pro, Ser, Cys, Trp, Tyr oder Gln und die Variablen X<sup>1</sup> bis X<sup>5</sup>, eine Aminosäure  
ausgewählt aus der Gruppe Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Phe, Pro,  
10 Ser, Thr, Cys, Met, Trp, Tyr, Asn, Gln, Asp, Glu, Lys, Arg, His und

wobei mindestens eine der Variablen X<sup>1</sup> bis X<sup>6</sup> in der Sequenz unabhängig voneinander Gln oder Asn bedeutet.

15 Vorteilhafteweise bedeutet in der Sequenz mindestens eine der Variablen X<sup>1</sup> bis X<sup>6</sup> außerdem unabhängig voneinander Lys oder Arg. Weitere vorteilhafte in den Variablen X<sup>1</sup> bis X<sup>6</sup> enthaltene Aminosäuren sind Glu, Lys, Arg, Tyr, Cys, Lys, His, Asp oder Met. Be-  
20 vorzugt sind die Aminosäuren Cys, Glu, Lys, Tyr oder Arg enthal-ten, besonders bevorzugt Cys. Diese Aminosäuren tragen zu einer vorteilhaften Bindung der Peptidfragmente an die immobilisierten Metallionen bei. Außerdem sind vorteilhafteweise nicht mehr als vier bevorzugt drei Histidinreste in Folge in der Sequenz ent-  
25 halten.

Weiter haben die Variablen X<sup>1</sup> bis X<sup>6</sup> in der Sequenz unabhängig voneinander folgende vorteilhafte bevorzugte Bedeutung:

30 X<sup>1</sup> = eine Aminosäure ausgewählt aus der Gruppe Ala, Val, Phe, Ser, Met, Trp, Tyr, Asn, Asp oder Lys, besonders bevorzugt Phe, Ser, Asn, Asp oder Lys, ganz besonders bevorzugt Asn;

X<sup>2</sup> = eine Aminosäure ausgewählt aus der Gruppe Val, Ile, Phe, Pro,  
35 Trp, Tyr, Gln, Glu oder Arg, besonders bevorzugt Val, Ile, Phe, Pro, Gln, Glu oder Arg, ganz besonders bevorzugt Gln, Glu oder Arg;

X<sup>3</sup> = eine Aminosäure ausgewählt aus der Gruppe Gly, Ile, Thr, Met,  
40 Trp, Tyr, Asn, Gln, Asp, Glu, Lys, Arg oder His, besonders bevorzugt Gly, Ile, Thr, Met, Trp, Tyr, Asn, Asp, Glu, Arg oder His, ganz besonders bevorzugt Gly, Thr oder Tyr;

5

X<sup>4</sup> = eine Aminosäure ausgewählt aus der Gruppe Val, Phe, Pro, Cys, Met, Trp, Asn, Glu, Arg oder His, besonders bevorzugt Val, Phe, Cys, Met, Trp, Asn, Arg oder His, ganz besonders bevorzugt Asn oder Arg;

5

X<sup>5</sup> = eine Aminosäure ausgewählt aus der Gruppe Gly, Ser, Cys, Met, Trp, Asn, Glu, Lys oder Arg, besonders bevorzugt Gly, Ser, Cys, Met, Asn, Glu, Lys oder Arg, ganz besonders bevorzugt Gly oder Lys;

10

X<sup>6</sup> = eine Aminosäure ausgewählt aus der Gruppe Phe, Pro, Ser, Cys, Trp, Tyr oder Gln, besonders bevorzugt Phe, Ser, Cys, oder Tyr, ganz besonders bevorzugt Cys.

15 Die Variablen X<sup>1</sup> bis X<sup>6</sup> in der Sequenz His-X<sup>1</sup>-His-X<sup>2</sup>-X<sup>3</sup>-X<sup>4</sup>-Cys-X<sup>5</sup>-X<sup>6</sup>-Cys können unabhängig voneinander die verschiedenen bevorzugten Bedeutungen haben, wobei einzelne Variablen bis maximal fünf der Variablen eine Aminosäure ausgewählt aus der Gruppe Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Phe, Pro, Ser, Thr, Cys, Met, Trp, Tyr, Asn, Gln, 20 Asp, Glu, Lys, Arg, His bedeuten.

Besonders bevorzugte Peptidfragmente sind Fragmente mit den Sequenzen

25 His-Gln-His-Glu-Gly-Arg-Cys-Lys-Glu-Cys

His-Asn-His-Arg-Tyr-Gly-Cys-Gly-Cys-Cys

His-Arg-His-Gly-Thr-Asn-Cys-Leu-Lys-Cys

30

His-Ile-His-Gln-Ser-Asn-Cys-Gln-Val-Cys.

Die oben genannte Proteinfragmentsequenz wird durch die erfindungsgemäßen Nukleinsäurefragmente kodiert. Hierbei ist der 35 degenerierte genetische Code zu berücksichtigen. Die erfindungsgemäßen Nukleinsäurefragmente können prinzipiell in beliebigen Nukleinsäuren enthalten sein. Vorteilhaftweise werden die Nukleinsäurefragmente in Vektoren so inseriert, daß die Herstellung von zusammengesetzten Nukleinsäuresequenzen (= Genkonstrukte), die für die erfindungsgemäßen Fusionsproteine kodieren, ermöglicht wird. Diese Genkonstrukte können zur Expression vorteilhaft in einen geeigneten Wirtsorganismus verbracht werden, der eine optimale Expression des Fusionsproteins ermöglicht. Geeignete Vektoren sind dem Fachmann wohl bekannt 40 und können beispielsweise aus dem Buch Cloning Vectors (Eds. Pouwels P. H. et al. Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, 1985, ISBN 0 444 904018) entnommen werden. Unter Vektoren sind außer 45

Plasmiden auch alle anderen dem Fachmann bekannten Vektoren wie beispielsweise Phagen, Viren, Transposons, IS-Elemente, Plasmide, Cosmide, lineare oder zirkuläre DNA zu verstehen. Diese Vektoren können sich autonom im Wirtsorganismus replizieren oder chromosomal repliziert werden.

Unter den erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen sind Sequenzen zu verstehen, die mit einem oder mehreren Regulationssignalen vorteilhaftweise zur Erhöhung der Genexpression funktionell verknüpft wurden. Diese Sequenzen können 3' und/oder 5' terminale regulatorische Sequenzen zur Steigerung der Expression sein, die je nach ausgewähltem Wirtorganismus und Gen für eine optimale Expression ausgewählt werden. Beispielsweise handelt es sich bei diesen regulatorischen Sequenzen um Sequenzen an die Induktoren oder Repressoren binden und so die Expression der Nukleinsäuren regulieren. Das Genkonstrukt kann außerdem vorteilhaftweise auch eine oder mehrere sogenannte "enhancer Sequenzen" funktionsmäßig verknüpft mit dem Promotor enthalten, die eine erhöhte Expression der Nucleinsäuresequenz ermöglichen. Dies kann beispielsweise über eine verbesserte Wechselwirkung zwischen RNAPolymerase und DNA erfolgen. Auch am 3'-Ende der DNA-Sequenzen können zusätzliche vorteilhafte Sequenzen inseriert werden wie weitere regulatorische Elemente oder Terminatoren. Die erfindungsgemäßen Nukleinsäurefragmente werden vorteilhaft im Vektor so inseriert, daß sie die N-terminale Region des Fusionsproteins bilden. Sie können jedoch auch am C-Terminus lokalisiert sein oder aber innerhalb des Proteins liegen, wobei jedoch die Funktion des Proteins nicht beeinflußt sein darf und ein Ausschneiden aus dem Fusionsprotein nicht mehr möglich ist.

Die regulatorischen Sequenzen sollen die gezielte Expression der Gene und der Proteinexpression ermöglichen. Dies kann beispielsweise je nach Wirtsorganismus bedeuten, daß das Gen erst nach Induktion exprimiert oder überexprimiert wird, oder daß es sofort exprimiert und/oder überexprimiert wird.

Vorteilhafte Regulationssequenzen sind beispielsweise in Promotoren wie cos-, tac-, trp-, tet-, trp-tet-, lpp-, lac-, lpp-lac-, lacI<sub>Q</sub>-, T7-, T5-, T3-, gal-, trc-, ara-, SP6-, λ-P<sub>R</sub>- oder im λ-P<sub>L</sub>-Promotor enthalten, die vorteilhaftweise in gram-negativen Bakterien Anwendung finden. Weitere vorteilhafte Regulationssequenzen sind beispielsweise in den gram-positiven Promotoren amy und SPO2, in den Hefe- oder Pilzpromotoren ADC1, Mfα, AC, P-60, CYC1, GAPDH, TEF, rp28, ADH oder in den Pflanzenpromotoren CaMV/35S, SSU, OCS, lib4, usp, STLS1, B33, nos oder im Ubiquitin- oder Phaseolin-Promotor enthalten. In diesem Zusammenhang sind auch die Promotoren der Pyruvatdecarboxylase und der Methanol-

oxidase aus beispielsweise Hansenula vorteilhaft. Es können auch künstliche Promotoren für die Regulation verwendet werden.

Die regulatorischen Sequenzen bzw. Faktoren können dabei vorzugsweise die Genexpression des eingeführten Gens positiv beeinflussen und dadurch erhöhen. So kann eine Verstärkung der regulatorischen Elemente vorteilhafterweise auf der Transkriptionsebene erfolgen, indem starke Transkriptionssignale, wie die genannten Promotoren und/oder "Enhancer" verwendet werden. Daneben ist aber auch eine Verstärkung der Translation möglich, indem beispielsweise die Stabilität der mRNA verbessert wird.

Vorteilhafterweise enthalten die erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen auch Signale, die eine Sekretion der Proteine ins Medium oder in Zellkompartimente ermöglichen. Als Beispiel für derartige Sequenzen seien die typischen Signalsequenzen wie beispielsweise die Signalsequenz von ompA (*E. coli*-Membranprotein) genannt. Daneben können weitere vorteilhafte Sequenzen wie die Sequenz des  $\alpha$ -Faktor enthalten sein oder sog. YACS (= Yeast artificial chromosomes) verwendet werden.

Die erfindungsgemäßen Genkonstrukte (= Nukleinsäuresequenzen) enthalten vorteilhafterweise außerdem noch Sequenzen, die eine Abspaltung der erfindungsgemäßen Proteinfragmente mit der oben genannten Sequenz vom N- oder C-Terminus des Fusionsproteins bevorzugt vom N-Terminus ermöglichen. Diese Sequenzen kodieren beispielsweise für Schnittstellen verschiedenster Proteasen wie beispielsweise für Faktor Xa, Enterokinase, humanen Renin, Carboxypeptidase A, Thrombin, Trypsin, Dipeptidylpeptidasen, Papain, Plasmin, Pepsin oder sonstigen Proteasen. Bevorzugt werden Schnittstellen für Faktor Xa, humanen Renin, Dipeptidylpeptidasen, Carboxypeptidase A oder Enterokinase, da diese Enzyme eine hohe Spezifität besitzen und so ein unerwünschter Verdau des zu reinigenden Proteins vermieden werden kann. Werden andere Proteasen verwendet, so ist darauf zu achten, daß keine Schnittstellen innerhalb des zu reinigenden Proteins sind. Das Proteinfragment kann auch über eine Bromcyanspaltung [z.B 2-(2-Nitrophenylsulfenyl)-3-brom-3'-methylindolinium, Hydroxylamin etc.] in Gegenwart von Ameisensäure entfernt werden. Hierbei ist jedoch in der Regel eine Rückfaltung des Proteins erforderlich, was dazu führt, daß diese Methode weniger bevorzugt ist. Auch eine Abspaltung des Proteinfragments über einen Exoproteaseverdau (kinetisch kontrolliert) ist möglich. Hierbei entstehen jedoch in der Regel Produktgemische. Bevorzugt werden Schnittstellen verwendet, die eine Entfernung der Proteinfragmente ohne das Zurücklassen von Proteinfragmentresten im zu reinigenden Protein ermöglichen. Können im Fusionsprotein die erfindungsgemäßen Proteinfragmente

ohne Funktionsverlust und ohne sonstige Nachteile toleriert werden, so kann auf eine spezielle Stelle zur Abtrennung des Proteinfragments verzichtet werden.

- 5 Als Vektoren sind prinzipiell alle Vektoren geeignet, die eine Expression in pro- oder eukaryontischen Zellen ermöglichen. Dabei können Vektoren verwendet werden, die nur in einer Gattung replizieren oder solche, die in mehreren Gattungen replizieren (= sog. shuttle-vectoren). Vorteilhafte Vektoren sind beispiels-  
10 weise Plasmide wie die E. coli-Plasmide pEGFP, pLG338, pACYC184, pBR322, pUC18, pUC19, pKC30, pRep4, pHS1, pHS2, pPLc236, pMBL24, pLG200, pUR290, pIN-III<sup>113</sup>-B1, λgt11 oder pBdCI, bevorzugt pEGFP, in Streptomyces pIJ101, pIJ364, pIJ702 oder pIJ361, in Bacillus pUB110, pC194 oder pBD214, in Corynebacterium pSA77 oder pAJ667,  
15 in Pilzen pALS1, pIL2 oder pBB116, in Hefen 2μM, pAG-1, YEp6, YEp13 oder pEMBLYe23 oder in Pflanzen pLGV23, pGHlac<sup>+</sup>, pBIN19, pAK2004 oder pDH51. Die genannten Plasmide stellen eine kleine Auswahl der möglichen Plasmide dar. Weitere Plasmide sind dem Fachmann wohl bekannt und können beispielsweise aus dem oben ge-  
20 nannten Buch Cloning Vectors (Eds. Pouwels P. H. et al. Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, 1985 , ISBN 0 444 904018) entnommen werden.

- In einer weiteren Ausgestaltungsform des Vektors kann die erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz auch vorteilhafterweise in Form einer linearen DNA in die Mikroorganismen eingeführt werden und über heterologe oder homologe Rekombination in das Genom des Wirtsorganismus integriert werden. Diese lineare DNA kann aus einem linearisierten Vektor wie einem Plasmid oder nur aus der Nukleinsäure, d.h. dem Nukleinsäurefragment und dem Gen für das Protein (= Fusionsproteingen) sowie gegebenenfalls weiteren regulatorischen Sequenzen bestehen.  
25  
30

- Als Wirtsorganismen für das erfindungsgemäße Genkonstrukt kommen prinzipiell alle prokaryontischen oder eukaryontischen Organismen in Frage. Vorteilhafterweise werden als Wirtsorganismen Mikro-organismen wie gram-positive oder gram-negative Bakterien, Archaeabakterien, Pilze, Hefen, tierische oder pflanzliche Zellen wie Drosophila speziell D. melanogaster, Maus, Zebrafisch oder Tabak verwendet. Bevorzugt werden gram-positive oder gram-  
40 negative Bakterien, Pilze oder Hefen, besonders bevorzugt die Gattungen Escherichia, Bacillus, Streptomyces, Aspergillus oder Saccharomyces, ganz besonders bevorzugt E. coli verwendet.

- 45 Besonders bevorzugt sind folgende Kombinationen aus Vektor und Wirtsorganismus wie Escherichia coli und seinen Plasmiden und Phagen und den dazugehörigen Promotoren sowie Bacillus und seine

Plasmide und Promotoren, Streptomyces und seine Plasmide und Promotoren, Aspergillus und seine Plasmide und Promotoren oder Saccharomyces und seine Plasmide und Promotoren zu verstehen.

- 5 Die erfindungsgemäßen Fusionsproteine lassen sich wie oben beschrieben in einem Verfahren herstellen, wobei die erfindungsgemäßen Nukleinsäurefragmente, die für die Proteinfragmente mit der oben genannten Sequenz kodieren, mit einem Gen, das für die zu reinigenden Proteine kodiert, und gegebenenfalls weiteren 10 vorteilhaften Sequenzen wie Promotor- und/oder Enhancersequenzen, Schnittstellen für Proteasen etc. fusioniert werden. Dazu wird falls erforderlich eine geeignete Restriktionsenzymschnittstelle zwischen dem Nukleinsäurefragment und dem Gen des zu reinigenden Proteins eingeführt und dieses Konstrukt über geeignete Schnittstellen 15 in einen Vektor inseriert. Derartige Methoden sind dem Fachmann bekannt und können beispielsweise aus den Lehrbüchern von Sambrook, J. et al. (1989) Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, von F.M. Ausubel et al. (1994) Current protocols in molecular biology, John Wiley 20 and Sons oder D.M. Glover et al., DNA Cloning Vol.1, (1995), IRL Press (ISBN 019-963476-9) entnommen werden. Weitere vorteilhafte Vektoren sind die Pichia pastoris Vektoren pPic und pGap. Diese Hefe ist auch ein geeigneter Wirtsorganismus für die Proteinexpression.

- 25 Die erfindungsgemäßen Proteinfragmente eignen sich zur Herstellung von Fusionsproteinen, die mit Hilfe der Proteinfragmente leicht, kostengünstig und effizient aufgereinigt werden können. Die erfindungsgemäßen Proteinfragmente und Fusionsproteine können 30 so vorteilhafterweise sehr selektiv in guten Ausbeuten, mit hoher Reinheit gereinigt werden. Die erfindungsgemäßen Proteinfragmente und damit die aus ihnen hergestellten Fusionsproteine zeichnen sich vorteilhaft durch eine im Vergleich zur Helicobacter pilori ATPase-439 Sequenz um mindestens 1,5 fach stärkere Bindung an die 35 immobilisierten Metallionen aus.

- Zur Herstellung der Fusionsproteine sind prinzipiell alle Proteine geeignet. Bevorzugt werden Proteine verwendet, die eine biologische Wirkung in Mensch, Tier oder Pflanze zeigen oder die 40 für organische Synthese interessant sind. Hierbei handelt es sich beispielsweise um Proteine wie Enzyme, Hormone, Speicher- oder Bindungs- oder Transportproteine. Beispielhaft seien Proteine wie Hydrolasen wie Lipasen, Esterasen, Amidasen, Nitrilasen, Proteasen, Mediatoren wie Cytokine z.B. Lymphokine wie MIF, MAF, TNF, 45 Interleukine wie Interleukin 1, Interferone wie  $\gamma$ -Interferon, tPA, Hormone wie Proteohormone, Glykohormone, Oligo- oder Polypeptidhormone wie Vassopressin, Endorphine, Endostatin, Angiostatin,

10

Wachstumsfaktoren Erythropoietin, Transkriptionsfaktoren, Integrine wie GPIIb/IIIa oder  $\alpha_v\beta III$ , Rezeptoren wie die verschiedenen Glutamatrezeptoren, Angiogenesefaktoren wie Angiotensin genannt.

5

Das erfindungsgemäße Verfahren zur Reinigung von Fusionsproteinen ermöglicht beispielsweise die Reinigung von Proteinen aus natürlichen Quellen wie Pflanzen- oder Tierextrakten, Pflanzen- oder Tierzell-Lysaten, aus Kulturmedien, Fermentationsbrühen oder aus

10 Synthesebrühen um nur einige beispielhaft zu nennen.

Das erfindungsgemäße Verfahren umfaßt folgende Reaktionsschritte:

- a) Die Flüssigkeit(en), die das Fusionsprotein enthalten, werden 15 so mit immobilisierten Metallionen in Kontakt gebracht, daß sich zwischen den Metallionen und dem Fusionsprotein eine Affinitätsbindung ausbilden kann,
- b) Entfernen nicht gebundener in der Flüssigkeit enthaltener 20 Substanzen,
- c) Eluieren des gebundenen Fusionsproteins, in dem die Affinitätsbindung durch Änderung des Flüssigkeitsmediums aufgehoben wird und
- 25 d) Sammlung des gereinigten Fusionsprotein.

Vorteilhaft wird das Fusionsprotein in einem geeigneten Wirtsorganismus (siehe oben) vor der Reinigung exprimiert um die Ausbeute an Fusionsprotein zu erhöhen. Der Wirtsorganismus wird in einem geeigneten synthetischen oder komplexen Medium, das eine Kohlenstoffquelle, eine Stickstoffquelle und gegebenenfalls anorganische Salze, Vitamine und Spurenelemente enthält, bei geeigneter Temperatur und Belüftung angezogen.

35

Je nach dem ob das Fusionsprotein aus den Zellen exkretiert wird oder nicht, werden die Zellen zunächst aufgeschlossen und die Zellen oder Zelltrümmer vorteilhafterweise abgetrennt. Für den Zellaufschluß werden dem Fachmann bekannte Methoden verwendet wie 40 Ultraschall, French press, Enzymaufschluß, osmotischer Schock und andere mehr. Die Abtrennung der Zellen oder Zelltrümmer kann beispielsweise über Zentrifugation oder Filtration erfolgen. Eine Abtrennung der Zellen oder Zelltrümmer ist jedoch nicht zwingend erforderlich.

45

## 11

Die die Fusionsproteine enthaltende Flüssigkeit wird anschließend mit den immobilisierten Metallionen in Kontakt gebracht, so daß sich eine Affinitätsbindung zwischen dem Fusionsprotein und den Metallionen ausbilden kann. Die Bindung erfolgt bei pH-Werten 5 größer 7, beispielsweise vorteilhaft bei pH 7,0 bis 9,0 bevorzugt zwischen pH 7,5 bis 8,0. Vorteilhafte Puffer sind einzelne Puffer oder Puffergemische wie beispielsweise 50 bis 1000 mM Puffer wie 50 mM Tris/HCl pH 8,0 + 150 mM NaCl; 100 mM NaAcetat pH 7,7 + 500 mM NaCl, 20 mM NaPhosphat pH 7,7 + 500 mM NaCl oder 50 mM 10 Tris/HCl pH 8,0 + 150 mM NH<sub>4</sub>Cl. Diese Puffer ermöglichen ein Auftragen der Fusionsproteine auf die immobilisierten Metallionen. Im einfachsten besonders vorteilhaften Fall werden die Fusionsproteine direkt im zum Aufschluß verwendeten Puffer oder im Inkubationsmedium mit den immobilisierten Metallionen in Kontakt 15 gebracht. Vorteilhafterweise werden die Flüssigkeiten und die immobilisierten Metallionen in einer üblichen Chromatographiesäule miteinander in Kontakt gebracht. Dies erleichtert das Entfernen nicht gebundener Substanzen beispielsweise Proteine durch Waschen der Säule mit einem geeigneten Puffer. Geeignete Puffer 20 sind Puffer, die die Bindung der erfindungsgemäßigen Proteinfragmente oder der Fusionsproteine an die Metallionen nicht stören und Verunreinigungen entfernen können. Solche Puffer haben vorzugsweise einen pH-Wert größer pH 7, vorteilhaft einen pH-Wert zwischen pH 7,0 bis 9,0, bevorzugt zwischen pH 7,5 bis 8,0. Auch 25 batch-Ansätze, bei denen die immobilisierten Metallionen in einem Gefäß vorgelegt werden und die Flüssigkeiten anschließend zugesetzt werden oder umgekehrt, können so gereinigt werden. Für diese batch-Ansätze können die genannten Puffer verwendet werden. Zwischen den einzelnen Waschschritten werden die Ansätze vorteil- 30 hafterweise zentrifugiert oder filtriert.

Für die Immobilisierung der Metallionen eignen sich prinzipiell alle üblichen Trägermaterialen, die sich leicht derivatisieren lassen, keine oder nur geringe unspezifische Adsorption aufweisen, gute physikalische, mechanische und chemische Stabilität 35 aufweisen und eine hohe äußere und innere Oberfläche aufweisen. Geeignete Materialien sind beispielsweise käuflich erwerbar von Pharmacia LKB, Schweden (Sepharose™6B oder Superose™), Pierce, USA (immobilisierte Iminodiessigsäure I oder II, immobilisiertes 40 Tris(carboxymethyl)ethylendiamin), Sigma, USA (immobilisierte Iminodiessigsäureagarose), Boehringer Mannheim, Deutschland (Zinkchelatagarose) oder Toyo Soda, Japan (TSKgel Chelate-5PW). In EP-B-0 253 303 werden weitere geeignete Materialien beschrieben. Weitere geeignete vorteilhafte Materialien sind Materialien 45 wie Ni-beschichtete Mikrotiterplatten (Nickel-chelate coated

Flashplate®, Nen life science products) oder Magnetpartikel oder speziell mit Metallionen behandelte und bindende Membranen.

Die verschiedenen Metallionen werden in geeigneten Materialien  
5 vorteilhaft über Gruppen wie IDA (= Imminodiessigsäure), NTA (= Nitritotriessigsäure) oder TED (= Tris(carboxymethyl)ethylen-  
diamin gebunden. Geeignete Metallionen sind Co, Cu, Fe, Ca, Mg,  
Ni, Al, Cd, Hg oder Zn, bevorzugt werden Fe, Ni oder Cu, bes-  
onders bevorzugt Ni oder Cu, ganz besonders bevorzugt Ni. Die  
10 Beladung der Materialien mit Metallionen erfolgt vorteilhaft mit  
0,1 bis 0,4 M Lösungen der Metallsalze in wäßriger, ungepufferter  
Lösung.

Nach dem Waschen wird das Fusionsprotein mit einem geeigneten  
15 Puffer eluiert. Dieser Puffer hebt die Affinitätsbindung zwischen  
dem Fusionsprotein und den immobilisierten Metallionen auf. Die  
Fusionsproteine können über einen pH-Gradienten (niedrige pH-  
Werte < pH 7,0 wirken eluierend), kompetitive Liganden wie  
Imidazol, organische Lösungsmittel wie Aceton oder Ethanol,  
20 chelatisierende Agentien wie EDTA oder NTA und/oder Detergentien  
wie Tween 80 eluiert werden. Bevorzugt wird eine Elution über  
kompetitive Liganden wie Imidazol und/oder Detergentien. Imidazol  
wird in einem Bereich von 0,05 bis 0,7 M, bevorzugt von 0,1 bis  
0,5 M zur Elution verwendet. Die kompetitiven Liganden und/oder  
25 Detergentien werden vorteilhaft in einem Puffer eingesetzt, aber  
auch die Verwendung in Wasser ist möglich. Vorteilhafte Puffer  
sind Puffer, die den Puffern entsprechen, die für das Auftragen  
auf die immobilisierten Metallionen verwendet wurden. Dies hat  
den Vorteil, daß keine unerwünschten Wechselwirkungen zwischen  
30 dem Säulenmaterial, den gebundenen Proteinen und dem Puffer auf-  
treten. Vorteilhafte Puffer haben vorzugsweise einen pH-Wert  
größer pH7, vorteilhaft einen pH-Wert zwischen pH 7,0 bis 9,0,  
bevorzugt zwischen pH 7,5 bis 8,0. Bevorzugt werden diese Puffer  
über einen steigenden Gradienten aufgebracht. Im Falle, daß mit  
35 einem pH-Gradient eluiert wird, können Puffer mit einem pH-Wert  
kleiner pH 7,0 und/oder Säuren verwendet werden. Das eluierte  
Fusionsprotein wird gesammelt und kann sofort verwendet werden,  
oder aber falls erforderlich und gewünscht weiter behandelt  
werden. Geeignete Auftrags- und Elutionspuffer sind beispiels-  
40 weise dem Lehrbuch Protein Purification (Eds. J.C. Janson, L.  
Rydén, VCH Publisher Inc., 1989, Seite 227 bis 251) zu entnehmen.

Das erfindungsgemäße Proteinfragment kann mit den oben beschrie-  
benen Methoden wie Bromcyan- oder Proteasespaltung entfernt  
45 werden. Hierbei können Reste des Proteinfragments im Molekül  
enthalten bleiben oder aber total aus dem zu reinigenden Protein

13

abgespalten werden. Vorteilhaft wird das Proteinfragment rückstandslos aus dem Protein entfernt.

Vorteilhaft geeignete Proteinfragmente für die Herstellung von 5 Fusionsproteinen lassen sich durch folgendes erfindungsgemäße Verfahren screenen. Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Proteinfragmenten, die in der Lage sind mit immobilisierten Metallionen eine reversible Affinitätsbindung einzugehen, dadurch gekennzeichnet, daß man folgende Schritte 10 durchführt:

- a) Herstellung einer Nukleinsäurebibliothek ausgehend von einer beliebigen Nukleinsäuresequenz, die für ein Proteinfragment der Sequenz

15

His-X<sup>1</sup>-His-X<sup>2</sup>-X<sup>3</sup>-X<sup>4</sup>-Cys-X<sup>5</sup>-X<sup>6</sup>-Cys,

kodiert, wobei die Histidin- und Cysteinreste der Sequenz in der Nukleinsäurebibliothek konserviert werden,

20

- b) Fusion der Nukleinsäuren der Bibliothek an ein Reportergen, das die Detektion des durch die erhaltene Nukleinsäure kodierten Fusionsproteins über seine Bindung an die immobilisierten Metallionen ermöglicht und

25

- c) Auswahl der Nukleinsäuresequenzen, die eine gegenüber der in der natürlichen Helicobacter pilori ATPase-439 Sequenz um mindestens 1,5 fach stärkere reversible Bindung an die immobilisierten Metallionen aufweisen.

30

Die Nukleinsäurebibliothek ausgehend von der oben genannten Sequenz lässt sich über dem Fachmann bekannte Methoden zur Mutagenese erstellen. Hierzu kann die Sequenz beispielsweise einer "site directed mutagenesis" unterzogen werden wie sie 35 in D.M. Glover et al., DNA Cloning Vol.1, (1995), IRL Press (ISBN 019-963476-9), Kapitel 6, Seite 193 ff beschrieben wird.

Von Spee et al. (Nucleic Acids Research, Vol. 21, No. 3, 1993: 777 - 778) wird eine PCR-Methode unter Verwendung von dITP zur 40 zufälligen Mutagenese beschrieben.

Die Verwendung einer "in vitro" Rekombinationstechnik für die molekulare Evolution wird von Stemmer (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 91, 1994: 10747 - 10751) beschrieben.

45

Von Moore et al. (Nature Biotechnology Vol. 14, 1996: 458 - 467) wird die Kombination der PCR- und Rekombinationsmethode beschrieben.

- 5 Die Verwendung einer "in vitro" Rekombinationstechnik für die molekulare Evolution wird von Stemmer (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 91, 1994: 10747 - 10751) beschrieben. Auch die Kombination der beiden Methoden kann verwendet werden.
- 10 Die Verwendung von Mutationsstämmen mit Defekten im DNA-Reparatursystem wird von Bornscheuer et al. (Strategies, 11, 1998: 16 - 17) beschrieben. Von Rellos et al. wird eine PCR-Methode unter Verwendung von nichtäquimolaren Nucleotidmengen (Protein Expression and Purification, 5, 1994: 270 - 277) beschrieben.
- 15

Vorteilhaft lässt sich die Nukleinsäurebibliothek über eine PCR-Technik mit Hilfe zweier komplementärer, degenerierter Oligonukleotide (= sog. wobble-primer), wie in den Beispielen beschrieben, erzeugen. Wichtig ist, daß die in der Sequenz enthaltenen Histidin- und Cysteinreste konserviert werden.

Zum Screening auf Proteinfragmente mit einer verbesserten Metallbindungsaffinität wird das erfundungsgemäße Nukleinsäurefragment, das für das Proteinfragment kodiert, an ein Reportergen fusioniert. Vorteilhafte Reportergene ermöglichen eine leichte Detektion der Bindung an die immobilisierten Metallionen über beispielsweise eine Bindung von mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierten Antikörpern, die gegen das Reportergen gerichtet sind, oder über selbst fluoreszierende Proteine wie das vorteilhafte bevorzugte egf-Protein von *E. coli* (= green fluorescent protein, siehe Prasher et al., Gene 111 (2), 1992: 229 - 233) oder das bevorzugte Biolumineszenzprotein von *Aequoria victoria* oder über Licht generierende Proteine wie das Luzeferin/Luzeferase-System. Besonders bevorzugt wird ein gfp-Proteinmutante (= egfp = enhanced green fluorescence protein) mit einer 35fach höheren Fluoreszenzaktivität, die durch zwei Punktmutationen an Position 64 Austausch von Phe gegen Leu und Position 65 Austausch von Ser gegen Thr verursacht wird, verwendet. Diese Proteinmutante hat den Vorteil gegenüber dem Wildtypprotein, daß es löslich ist und keine sog. "Inclusion Bodies" bildet. Die Verwendung des egfp-Proteins ermöglicht die Lokalisierung und Quantifizierung der Proteinkonzentration in jeder Phase der Reinigung der Proteine ohne Eingriff in die Reinigung und ohne Verwendung von weiterer Kofaktoren oder Substrate (Poppenborg et al., J. Biotechnol., 58 (2), 1997, 77 - 88). Außerdem zeichnet sich das egfp-Protein durch eine hohe Stabilität gegenüber einem weiten pH-Bereich (pH 5,5 bis 12), Bleichung durch Photooxidation, oxidierende und

schwach reduzierende Agentien wie 2% Mercaptoethanol aus. Das Protein zeigt eine Abnahme der Fluoreszenz oberhalb 37 °C. Ebenfalls geeignet als Reportergen sind das gfp-uv- (blue fluorescence) und das eyfp- (yellow fluorescence) Protein.

5

Die Auswahl der geeigneten Sequenzen erfolgt im Vergleich zur Bindungsaffinität an die immobilisierten Metallionen der folgenden natürlichen *Helicobacter pilori* ATPase-439 Sequenz His-Ile-His-Asn-Leu-Asp-Cys-Pro-Asp-Cys. Die erfindungsgemäßen

- 10 Proteinfragmentsequenzen weisen eine um mindestens 1,5 fach stärkere reversible Bindung an die immobilisierten Metallionen auf, bevorzugt eine mindestens zweifach, besonders bevorzugt mindestens dreifach stärkere reversible Bindung auf. Vorteilhafte Sequenzen ermöglichen eine Proteinausbeute nach der Reinigung von mindestens 20%, bevorzugt mindestens 30%, besonders bevorzugt von mindestens 40%, ganz besonders bevorzugt von mindestens 50%.

Das erfindungsgemäße Verfahren zum Screening der Nukleinsäurebibliothek eignet sich vorteilhaft für eine Automatisierung. Mit diesem Verfahren lässt sich einfach eine große Zahl von Nukleinsäurefragmenten bzw. Proteinfragmenten auf ihre Metallionenbindungsaffinität in einem sogenannten "High-Throughput-Screening" testen.

- 25 Mit den erfindungsgemäßen Proteinfragmenten lassen sich Proteine leicht detektieren. Im erfindungsgemäßen Verfahren zur Detektion von Proteinen werden aus einer Proteinmischung einzelne Proteine, die ein Proteinfragment mit den erfindungsgemäßen oben genannten Proteinfragmenten enthalten, über Antikörper nachgewiesen, die gegen das Proteinfragment gerichtet sind. Der Nachweis dieser 30 Fusionsproteine erfolgt vorteilhaft über mono- oder polyklonale Antikörper, die gegen das Proteinfragment (= Tag) gerichtet sind. Das Proteingemisch kann vorteilhaft vor dem Nachweis chromatographisch oder elektrophoretisch aufgetrennt werden und anschließend auf eine geeignete Membran (z.B. PVDF oder Nitrocellulose) mit 35 üblichen Methoden (siehe Sambrook et al.) überführt (= geblottet) werden. Anschließend wird diese Membran mit dem gegen das Tag gerichteten Antikörper inkubiert. Vorteilhaft wird die Membran mehrmals gewaschen und danach die gebundenen Antikörper über eine spezifische Reaktion mit einem beispielsweise Enzymkonjugierten 40 (z.B. alkalische Phosphatase, Peroxidase etc.) zweiten Antikörper der gegen die konstante Region des ersten gerichtet ist in einem sog. Western- oder Immuno-Blot nachgewiesen. Entsprechende Antikörper sind im Handel erhältlich. Im Falle der Verwendung von Magnetpartikel kann auf das Waschen verzichtet werden, die mit 45 Antikörpern beschichteten Magnetpartikel können über das Fischen mit Magneten gereinigt werden.

## 16

Die erfindungsgemäßen Proteinfragmente haben gegenüber den üblichen His-Tags bei der Proteindetektion den Vorteil, daß sie eine stärkere antigene Wirkung besitzen und so leichter zur Herstellung von Antikörpern gegen das Tag geeignet sind.

5

Die Erfindung wird durch die folgenden Beispiele weiter veranschaulicht.

Beispiele:

10

Für die Bindungstest an Metallchelatsäulen (= immobilisierte Metallionen) wurde die sog. "Chelating Sepharose Fast-Flow" von Pharmacia LKB, Uppsala, Schweden verwendet. Ampicillin, Imidazol, EDTA und alle weiteren Reagentien wurden von Fluka (Buchs, Schweiz) bezogen.

15

Das verwendete DNA Gel-Extraktions-Kit, das Midi Plasmid-Kit und das PrepSpin Plasmid Kit stammten von Qiagen (Hilden, Deutschland), die Restriktionsenzyme, die DNA-modifizierenden Enzyme, die T4-DNA-Ligase und die Taq-Polymerase stammten von MBI Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland). Der Taq Dye Cycle Sequencing Kit wurde von Applied Biosystems (Weiterstadt, Deutschland) bezogen.

20

Für die Klonierungsversuche wurde der E. coli Stamm DH5 $\alpha$  (F $^-$  endA1 hsdR17 [rk $^+$ , mk $^+$ ] supE44 thiI  $\lambda$ gyrA96 relA1  $\Delta$  (argF lacZ $\alpha$ ) U169) verwendet. Die Plasmide, die das Gen für das egf-Protein enthielten, wurden von Clonetech USA bezogen. Die E. coli Stämme wurden bei 37 °C in Luria-Bertani Medium (= LB) mit 100 µg/ml Ampicillin zur Selektion der Klone auf Transformation mit dem egfp-Vektor angezogen. Der Lysepuffer enthielt 50 mM NaPhosphatpuffer pH 8,0, 300 mM NaCl, 1 mg/ml Lysozym und 1 mM PMSF (= Phenylmethansulfonylfourid = spez. Trypsin- und Chymotrypsin-Inhibitor).

25

Die DNA-Methoden wie Ligationen, Restriktionen, PCR oder Transformationen etc. wurden wie bei Sambrook, J. et al. (1989) Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press oder F.M. Ausubel et al. (1994) Current protocols in molecular biology, John Wiley and Sons beschrieben durchgeführt. Für die Sequenzierung wurde die Fluoreszenzmarkierte Dideoxy-DNA-Sequenzierungsmethode verwendet. Die DNA-Sequenzierung wurde mit dem Taq Dye Deoxy™ Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) und dem 373A DNA Sequencing System (Applied Biosystems) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

30

35

40

45

17

Beispiel 1: Herstellung zufällig mutagenisierter N-terminaler Metallbindungsstellen, die an das egfp-Gen gebundenen wurden, und des his6-egfp

5 Für die PCR-Reaktion wurde das Plasmid egfp und die zwei folgenden komplementären Oligonukleotide

5' -GCAATACCATGGGGCATNNNCATNNNNNNNTGTNNNNNTGTGTGAGGAAGGGCGAG-3'

10 5' -CAGTTGGAATTCTAGAG-3'

verwendet. Im Falle des his6-egfp wurden die folgenden zwei komplementären Primer

15 5' -GCAATACCATGGGGCATCATCATCATCATGTGAGGAAGGGCGAG-3'

5' -CAGTTGGAATTCTAGAG-3'

verwendet.

20 Die für die PCR-Reaktionen verwendeten Bedingungen waren wie folgt:

Ansatz: 8 µl dNTP Mix (200 µmol)

25 10 µl 10 x ThermoPolPuffer (New England Biolabs)

1 µl (100 pmol) Primer1

1 µl (100 pmol) Primer2

1 µl (100 ng) egfp Plasmid

79,5 µl Wasser

30 1 µl Deep Vent Polymerase (New England Biolabs)

PCR-Programm 95 °C 7min

95 °C 1min

56 °C 1min 30x

35 72 °C 3min

72 °C 7min

Die PCR-Produkte wurden jeweils mit NcoI und NotI verdaut und in den egfp-Vektor, der mit den gleichen Enzymen verdaut worden war, um Mutationen im Vektor auszuschließen legiert (siehe Figur 1).

40 Die PCR-Vektorligationen wurden zur Transformation von E. coli verwendet. Die Transformanden wurden auf LB-Agar mit 100 µg/ml Ampicillin plattiert und bei 37 °C inkubiert.

Beispiel 2: Kultivierungsbedingungen und Herstellung der Zell-Lysate

Transformierte Kolonien, die Fluoreszenz und einige die keine 5 Fluoreszenz zeigten, wurden ausgewählt und in 50 ml LB-Medium, das 100 µg/ml Ampicillin enthielt, angezogen. Für das High-Throughput-Screening wurden Kolonien ausgewählt, die Fluoreszenz zeigten, und in sterilen Mikrotiterplatten, die 250 µl LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin enthielten, inkubiert. Nach Inkubation 10 wurden die Kulturen zentrifugiert. Die Pellets wurden in 2 ml Lysepuffer resuspendiert, 20 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend mit Ultraschall aufgeschlossen (zweimal, 5 Minuten mit einem Branson Sonifier 250). Nach Zentrifugation (15 min, 4 C, 20000 x g) wurden die verschiedenen egfp-Mutanten im Überstand 15 erhalten. Alle ausgewählten Klone wurden sequenziert (siehe Tabelle I und II). Klone, die keine Fluoreszenz zeigten, enthielten Stopcodons in der Sequenz, so daß keine funktionellen Proteine exprimiert wurden (siehe Tabelle I, A8, A13, M16a, Z4, Z11 und Z13). In allen Versuchen wurde zur Quantifizierung der gebundenen 20 Proteine eine Fluoreszenzmessung durchgeführt, die in einem weiten Bereich mit der gfp-Konzentration korrelierte (siehe Figur 2).

Beispiel 3: Low-Throughput-Screening mit Ni-NTA-Säulen von 25 Quiagen

600 µl der lysierten Zellen wurden auf eine Ni-NTA-Säule aufgebracht, zweimal mit 600 µl einer Waschlösung (50 mM NaPhosphatpuffer, pH 8,0, 250 mM NaCl) gewaschen und anschließend mit einer 30 0,7 M Imidazollösung eluiert.

Beispiel 4: High-Throughput-Screening mit Membranfilterplatten

Für das High-Throughput-Screening wurden Membranfilter-Mikrotiterplatten (MultiScreen 5 µm; Fa. Millipore, Molsheim, Deutschland) verwendet. In jedes "Well" der Membranfilterplatten wurden 35 je dreimal 250 µl einer gerührten Chelatsepharosesuspension gegeben. Nach jeder Zugabe wurde die Sepharose abzentrifugiert (2 min, 23 °C, 350 rpm). Alle weiteren Schritte wurden in einem Beckmann Biomek 2000 Roboter durchgeführt. Die Minisäulen in den 40 Wells wurden zweimal mit 250 µl Wasser gewaschen. Anschließend wurde die Sepharose mit mit 250 µl einer Metallsalzlösung beladen und dreimal mit 200 µl Puffer (50 mM NaPhosphat, pH 8,0, 250 mM NaCl) äquilibriert. Für die verschiedenen Ansätze (Beladung mit Metallionen) wurden je 0,3 M NiCl<sub>2</sub>-<sup>2-</sup>, 0,3 M CuSO<sub>4</sub>- oder 0,3 M 45 ZnCl<sub>2</sub>-Lösungen verwendet. Es wurden wäßrige, ungepufferte Metallsalzlösungen verwendet. 200 µl der Zell-Lysatüberstände wurden auf jede dieser Minisäulen gegeben. Die Säulen wurden anschlie-

5 Send zweimal mit 250 µl Äquilibrierungspuffer gewaschen. Die gebundenen Proteine wurden mit zweimal 100 µl 0,5 M Imidazol in Äquilibrierungspuffer eluiert. Die Chelatsepharose in den Filtern kann mit 250 µl 50 mM EDTA, 1 M NaCl in Wasser regeneriert werden und für weitere Screeningversuche verwendet werden.

Beispiel 5: IMAC-Versuche

Für den Versuch wurde ein üblicher Chromatographieaufbau aus einer Glassäule, zwei peristaltischen Pumpen zum Aufbringen der Lösungen, einem UV-Detektor (LKB UV-MII), einem Drucker (LKB RIC 102) und einem Fraktionssammler (LKB FRAC-200) gewählt. Alle Geräte stammten von der Firma Pharmacia. Die Säule wurde mit chelatisierender Sepharose Fast-Flow Gel (Pharmacia) gefüllt, mit 15 7 Bettvolumen deinosiertem Wasser gewaschen und mit 7 Bettvolumen 0,3 M NiCl<sub>2</sub>-Lösung mit den Metallionen beladen. Anschließend wurde die Säule mit 7 Bettvolumen IMAC-Puffer (50 mM NaPhosphat, pH 8,0, 250 mM NaCl) gewaschen und äquilibriert. 1 ml Proben der Zell-Lysate wurden auf die Säule mit einer Flußrate von 20 1,5 ml/min aufgebracht und mit 10 Bettvolumen IMAC-Puffer gewaschen. Die Elution der gebundenen Proteine erfolgt über einen ansteigenden Gradienten mit 0,5% einer 0,5 M Imidazollösung pro ml Elutionslösung und schließlich 5 Bettvolumen einer 0,5 M Imidazol/Wasserlösung. Die Proteinfraktionen wurden über UV-Detektion ermittelt und gesammelt. Nach Abschluß wurde die Säule 25 mit 50 mM EDTA/1 M NaCl-Lösung gewaschen und regeneriert. Dieser Waschschnitt löst das Metall, gebundene Zellreste und Proteine von der Säule. Die eluierten Fraktionen wurden sowohl optisch als auch spektroskopisch untersucht. Einige der untersuchten Klone zeigten keine Affinität zur Matrix (siehe Tab.I, M15, M16) 30 während andere eine gute Bindung aufwiesen (siehe Tab.I, M13, Z5 und Z7). Die Klone M13 und Z5 eluierten in einer scharfen Bande von der Säule, während der Klon Z7 auf der Säule schmierte.

Beispiel 6: Vergleichsversuch mit egfp-Wildtyp und his-tag

35 Der Klon M13 wurde in einem Vergleichsversuch mit dem egfp-Wildtypprotein und den üblichen his-tags verglichen. Das egfp-Wildtypprotein bindet nicht an die Metallchelatsäulen. Nach dem Waschen der Säule war keine Fluoreszenz mehr auf der Säule detektierbar. Der Klon M13 bindet in einer scharfen Bande auf 40 der Säule während die his-tag-Proteine über die gesamte Säule binden. Dies ist auf einer geringere Affinität zurückzuführen, die letztlich zu einer geringeren Kapazität der Säule führt. Die Proteinausbeute liegt im Falle von M13 mit 56% höher als 45 mit den his-tags mit 48%.

Tabelle I: Bindungsversuche an Ni-Metallchelatsäulen

Klon	Aminosäuresequenz											
5	A6	His	Gln	His	Glu	Gly	Arg	Cys	Lys	Glu	Cys	gfp
	A8	His	Cys	His	Pro	Glu	Leu	Cys	Stop	Leu	Cys	gfp
	A13	His	Leu	His	Ser	Ile	Gly	Cys	Pro	Stop	Cys	gfp
	M13	His	Asn	His	Arg	Tyr	Gly	Cys	Gly	Cys	Cys	gfp
10	M14	His	Ser	His	Ser	Val	Gly	Cys	Phe	Phe	Cys	gfp
	M15	His	Gly	His	Thr	Leu	Ser	Cys	Gly	Leu	Cys	gfp
	M16	His	Ser	His	Thr	Leu	Arg	Cys	Lys	Gly	Cys	gfp
	M16a	His	Ser	His	Stop	Leu	Arg	Cys	Lys	Gly	Cys	gfp
15	Z4	His	Stop	His	Asn	Stop	Val	Cys	Ala	Thr	Cys	gfp
	Z5	His	Arg	His	Gly	Thr	Asn	Cys	Leu	Lys	Cys	gfp
	Z7	His	Ile	His	Gln	Ser	Asn	Cys	Gln	Val	Cys	gfp
	Z11	His	Thr	His	Ala	Ser	Gly	Cys	Stop	Stop	Cys	gfp
20	Z13	His	Cys	His	Thr	Trp	Cys	Cys	Asn	Stop	Cys	gfp

Die Klone A6, A10, M13, Z5 und Z7 binden gut an die Metallchelat-säule, während die Klone M14, M15 und M16 keine Bindung zeigten.

Tabelle II: Weitere sequenzierte im High-Throughput-Screening  
durch Fluoreszenz aufgefallene Klone

Klon	Aminosäuresequenz											
30	A1	His	Gly	His	Met	Glu	Arg	Cys	Leu	Val	Cys	gfp
	A2	His	Lys	His	Ala	Arg	Ser	Cys	Met	Gly	Cys	gfp
	A3	His	Phe	His	Thr	Val	Phe	Cys	Phe	Ser	Cys	gfp
	A4	His	Arg	His	Arg	Gly	Met	Cys	Thr	Ala	Cys	gfp
35	A12	His	Asp	His	Arg	Gly	Val	Cys	Gly	Leu	Cys	gfp
	A14	His	Asp	His	Glu	Arg	Leu	Cys	His	Asn	Cys	gfp
	X8	His	Gly	His	Gly	Asn	Arg	Cys	Cys	Gly	Cys	gfp
	X9	His	Arg	His	Gly	Thr	Ala	Cys	Met	Asp	Cys	gfp
40	X11	His	Ile	His	Ile	Met	Thr	Cys	Leu	Ser	Cys	gfp
	X12	His	Thr	His	Pro	Arg	Ser	Cys	Ala	Glu	Cys	gfp
	X15	His	Gly	His	Asp	Arg	Thr	Cys	Arg	Gly	Cys	gfp
	X16	His	Arg	His	Ala	Ile	Ser	Cys	Ile	Gly	Cys	gfp
45	X17	His	Ile	His	Arg	Gly	Asp	Cys	Tyr	Glu	Cys	gfp
	X18	His	His	His	Gly	Ser	Thr	Cys	Pro	Thr	Cys	gfp
	X19	His	His	His	Phe	His	Ser	Cys	Phe	Tyr	Cys	gfp
	Z8	His	Lys	His	Val	Asp	His	Cys	Gly	Arg	Cys	gfp

## 21

Klon	Aminosäuresequenz											
Z9	His	Ser	His	Leu	Thr	Leu	Cys	Leu	Gly	Cys	cfp	
Z10	His	Thr	His	Gln	Ser	Gln	Cys	Gly	Arg	Cys	gfp	
5 Z14	His	Arg	His	Leu	Phe	Trp	Cys	Ser	Glu	Cys	gfp	

## Beispiel 7: Metallbindungsaffinität

Viele der Klone zeigten eine bevorzugte Bindung an Ni<sup>2+</sup> oder Cu<sup>2+</sup>.

- 10 Im Falle von M13 konnte keine Bindung an Zn<sup>2+</sup> beobachtet werden. Bei Verwendung von Ni-Chelatsäulen zeigt der Klon M13 eine deutlich bessere Reinigung der Proteine im Vergleich zu den his-tags. Diese führten umgekehrt bei Verwendung von Cu-Chelatsäulen zu einem reineren Produkt im Vergleich zu M13, wobei jedoch, da die 15 Bindung an das Säulenmaterial in beiden Fällen sehr stark ist, durch die drastischen Elutionsbedingungen Cu-Ionen ausgewaschen wurden. Dies führt zu Produktverunreinigungen.

## Beispiel 8: Vergleichsversuch zwischen Sequenz der ATPase-439

- 20 und erfindungsgemäßen Proteinfragmenten

Der Vergleichsklon der ATPase-439 wurde analog Beispiel 1 und 6 durchgeführt. Als Primer wurde folgender Primer  
 5'-GCAATACCATGGGGCATATTCTAAATCTTGATTGTCTGATTGT-3' verwendet. Die 25 anderen Primer und die PCR-Bedingungen waren wie unter Beispiel 1 beschrieben.

Der Versuch wurde mit dem Quiagen Ni-NTA Spin Kit unter nativen Bedingungen durchgeführt, unter diesen Bedingungen wurde wie beschrieben lysiert; die bereits fertig beladenen Säulen wurden mit 30 600 µl 50 mM Na-Phosphatpuffer, pH 8,0, 300 mM NaCl äquilibriert und 2 min bei 2000 rpm (= 420 x g) zentrifugiert. Anschließend wurden 600 µl des Lysats aufgebracht und wie 2 min zentrifugiert. Mit je 600 µl 50 mM Na-Phosphatpuffer, pH 8,0, 300 mM NaCl wurde 35 zweimal gewaschen. Danach wurde mit 600 µl 50 mM Na-Phosphatpuffer, pH 8,0, 300 mM NaCl, 0,5 M Imidazol wurde zweimal eluiert. Die Ausbeute an reinem Protein war mit dem Klon M13 1,5fach höher als der Metallbindungsstelle des Vergleichsklons der ATPase-439. Klon M13 bindet damit besser und lässt sich auch besser eluieren.

40

45

## Patentansprüche

## 1. Peptidfragment mit der allgemeinen Sequenz

5

 $\text{His-X}^1\text{-His-X}^2\text{-X}^3\text{-X}^4\text{-Cys-X}^5\text{-X}^6\text{-Cys}$ ,

wobei die Variablen  $X^1$  bis  $X^6$  in der Sequenz die folgende Bedeutung haben:

10

$X^1$  = eine Aminosäure ausgewählt aus der Gruppe Ala, Val, Phe, Ser, Met, Trp, Tyr, Asn, Asp oder Lys und die Variablen  $X^2$  bis  $X^6$  eine Aminosäure ausgewählt aus der Gruppe Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Phe, Pro, Ser, Thr, Cys, Met, Trp, Tyr, Asn, Gln, Asp, Glu, Lys, Arg, His oder

15

$X^2$  = eine Aminosäure ausgewählt aus der Gruppe Val, Ile, Phe, Pro, Trp, Tyr, Gln, Glu oder Arg und die Variablen  $X^1$ ,  $X^3$  bis  $X^6$  eine Aminosäure ausgewählt aus der Gruppe Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Phe, Pro, Ser, Thr, Cys, Met, Trp, Tyr, Asn, Gln, Asp, Glu, Lys, Arg, His oder

20

$X^3$  = eine Aminosäure ausgewählt aus der Gruppe Gly, Ile, Thr, Met, Trp, Tyr, Asn, Gln, Asp, Glu, Lys, Arg, His und die Variablen  $X^1$ ,  $X^2$ ,  $X^4$  bis  $X^6$  eine Aminosäure ausgewählt aus der Gruppe Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Phe, Pro, Ser, Thr, Cys, Met, Trp, Tyr, Asn, Gln, Asp, Glu, Lys, Arg, His oder

25

$X^4$  = eine Aminosäure ausgewählt aus der Gruppe Val, Phe, Pro, Cys, Met, Trp, Asn, Glu, Arg oder His und die Variablen  $X^1$  bis  $X^3$ ,  $X^5$ ,  $X^6$  eine Aminosäure ausgewählt aus der Gruppe Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Phe, Pro, Ser, Thr, Cys, Met, Trp, Tyr, Asn, Gln, Asp, Glu, Lys, Arg, His oder

30

$X^5$  = eine Aminosäure ausgewählt aus der Gruppe Gly, Ser, Cys, Met, Trp, Asn, Glu, Lys oder Arg und die Variablen  $X^1$  bis  $X^4$ ,  $X^6$  eine Aminosäure ausgewählt aus der Gruppe Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Phe, Pro, Ser, Thr, Cys, Met, Trp, Tyr, Asn, Gln, Asp, Glu, Lys, Arg, His oder

35

40

Zeichn.

## 23

5         $X^6$  = eine Aminosäure ausgewählt aus der Gruppe Phe, Pro, Ser, Cys, Trp, Tyr oder Gln und die Variablen  $X^1$  bis  $X^5$  eine Aminosäure ausgewählt aus der Gruppe Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Phe, Pro, Ser, Thr, Cys, Met, Trp, Tyr, Asn, Gln, Asp, Glu, Lys, Arg, His und

wobei mindestens eine der Variablen  $X^1$  bis  $X^6$  in der Sequenz unabhängig voneinander Gln oder Asn bedeutet -:

10 2. Peptidfragment nach Anspruch 1, in der die Variablen  $X^1$  bis  $X^6$  die gemäß Anspruch 1 genannte Bedeutung haben, wobei mindestens eine der Variablen  $X^1$  bis  $X^6$  in der Sequenz unabhängig voneinander Lys oder Arg bedeutet.

15 3. Peptidfragment nach Anspruch 1 oder 2, in der die Variablen  $X^1$  bis  $X^6$  in der Sequenz unabhängig voneinander folgende Bedeutung haben:

20         $X^1$  = eine Aminosäure ausgewählt aus der Gruppe Ala, Val, Phe, Ser, Met, Trp, Tyr, Asn, Asp oder Lys;

$X^2$  = eine Aminosäure ausgewählt aus der Gruppe Val, Ile, Phe, Pro, Trp, Tyr, Gln, Glu oder Arg;

25         $X^3$  = eine Aminosäure ausgewählt aus der Gruppe Gly, Ile, Thr, Met, Trp, Tyr, Asn, Gln, Asp, Glu, Lys, Arg oder His;

$X^4$  = eine Aminosäure ausgewählt aus der Gruppe Val, Phe, Pro, Cys, Met, Trp, Asn, Glu, Arg oder His;

30         $X^5$  = eine Aminosäure ausgewählt aus der Gruppe Gly, Ser, Cys, Met, Trp, Asn, Glu, Lys oder Arg;

35         $X^6$  = eine Aminosäure ausgewählt aus der Gruppe Phe, Pro, Ser, Cys, Trp, Tyr oder Gln.

4. Peptidfragment nach den Ansprüchen 1 bis 3, in der die Variablen  $X^1$  bis  $X^6$  in der Sequenz unabhängig voneinander folgende Bedeutung haben:

40         $X^1$  = eine Aminosäure ausgewählt aus der Gruppe Phe, Ser, Asn, Asp oder Lys;

45         $X^2$  = eine Aminosäure ausgewählt aus der Gruppe Val, Ile, Phe, Pro, Gln, Glu oder Arg;

## 24

X<sup>3</sup> = eine Aminosäure ausgewählt aus der Gruppe Gly, Ile, Thr, Met, Trp, Tyr, Asn, Asp, Glu, Arg oder His;

5 X<sup>4</sup> = eine Aminosäure ausgewählt aus der Gruppe Val, Phe, Cys, Met, Trp, Asn, Arg oder His;

X<sup>5</sup> = eine Aminosäure ausgewählt aus der Gruppe Gly, Ser, Cys, Met, Asn, Glu, Lys oder Arg;

10 X<sup>6</sup> = eine Aminosäure ausgewählt aus der Gruppe Phe, Ser, Cys, oder Tyr.

5. Peptidfragment nach den Ansprüchen 1 bis 4, in der die Variablen X<sup>1</sup> bis X<sup>6</sup> in der Sequenz unabhängig voneinander 15 folgende Bedeutung haben:

X<sup>1</sup> = Asn;

20 X<sup>2</sup> = Gln, Glu oder Arg;

X<sup>3</sup> = Gly, Thr oder Tyr;

X<sup>4</sup> = Asn oder Arg;

25 X<sup>5</sup> = Gly oder Lys;

X<sup>6</sup> = Cys.

6. Peptidfragmente mit den Sequenzen  
30 His-Gln-His-Glu-Gly-Arg-Cys-Lys-Glu-Cys

His-Asn-His-Arg-Tyr-Gly-Cys-Gly-Cys-Cys

35 His-Arg-His-Gly-Thr-Asn-Cys-Leu-Lys-Cys

His-Ile-His-Gln-Ser-Asn-Cys-Gln-Val-Cys.

7. Fusionsprotein enthaltend ein Proteinfragment gemäß den 40 Ansprüchen 1 bis 6.

8. Nukleinsäurefragment kodierend für ein Proteinfragment gemäß den Ansprüchen 1 bis 6.

45 9. Nukleinsäuren enthaltend ein Nukleinsäurefragment gemäß Anspruch 8.

25

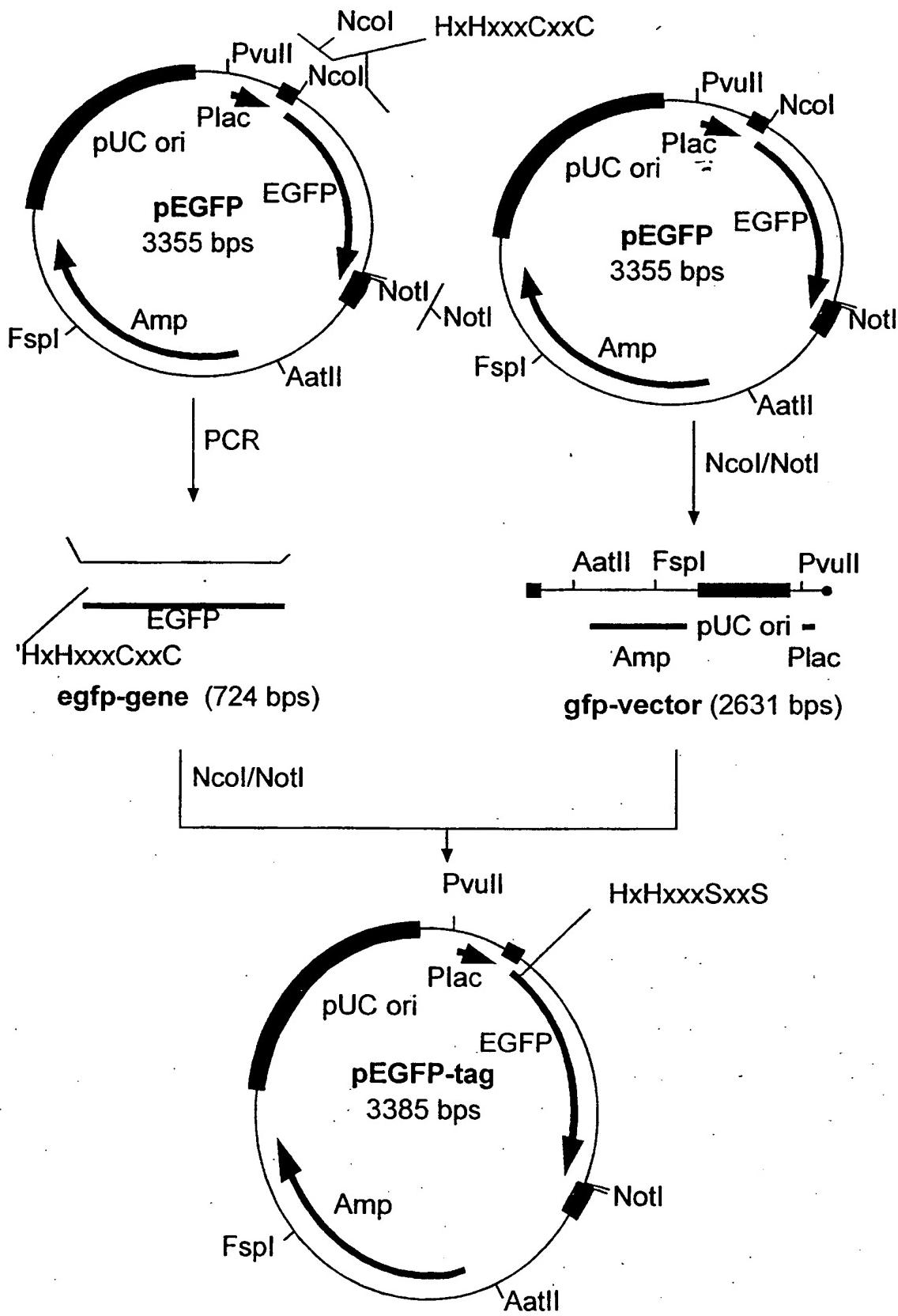
10. Nukleinsäuren kodierend für ein Fusionsprotein gemäß Anspruch 7.
11. Vektor enthaltend ein Nukleinsäurefragment gemäß Anspruch 8  
5 oder 10.
12. Verfahren zur Herstellung von Fusionsproteinen gemäß Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß man ein Nuklein-säurefragment gemäß Anspruch 8 mit einem Gen, das für ein  
10 Protein kodiert, fusioniert.
13. Verfahren zur Reinigung von Fusionsproteinen gemäß Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß man  
15 a) Flüssigkeiten, die das Fusionsprotein enthalten, so mit immobilisierten Metallionen in Kontakt bringt, daß sich zwischen den Metallionen und dem Fusionsprotein eine Affinitätsbindung ausbilden kann,
- 20 b) Entfernen nicht gebundener in der Flüssigkeit enthaltener Substanzen,
- 25 c) Eluieren des gebundenen Fusionsproteins, in dem die Affinitätsbindung durch Änderung des Flüssigkeits milieus aufgehoben wird und  
d) Sammlung des gereinigten Fusionsprotein.
- 30 14. Verwendung eines Proteinfragments gemäß den Ansprüchen 1 bis 6 oder eines Nukleinsäurefragments gemäß Anspruch 8 zur Reinigung von Proteinen .
- 35 15. Verfahren zur Herstellung von Proteinfragmenten, die in der Lage sind mit immobilisierten Metallionen eine reversible Affinitätsbindung einzugehen, dadurch gekennzeichnet, daß man folgende Schritte durchführt:  
40 a) Herstellung einer Nukleinsäurebibliothek ausgehend von einer beliebigen Nukleinsäuresequenz, die für ein Proteinfragment der Sequenz  
$$\text{His-X}^1\text{-His-X}^2\text{-X}^3\text{-X}^4\text{-Cys-X}^5\text{-X}^6\text{-Cys}$$
,  
45 kodiert, wobei die Histidin- und Cysteinreste der Sequenz in der Nukleinsäurebibliothek konserviert werden,

**26**

- b) Fusion der Nukleinsäuren der Bibliothek an ein Reporter-  
gen, das die Detektion des durch die erhaltene Nuklein-  
säure kodierten Fusionsproteins über seine Bindung an die  
immobilisierten Metallionen ermöglicht und
- 5 c) Auswahl der Nukleinsäuresequenzen, die eine gegenüber der  
in der natürlichen Helicobacter pilori ATPase-439 Sequenz  
um mindestens 1,5 fach stärkere reversible Bindung an die  
immobilisierten Metallionen aufweisen.
- 10 16. Verfahren nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß als  
Reportergen das egf-Protein von Aequoria victoria verwendet  
wird.
- 15 17. Verfahren zur Detektion von Proteinen, dadurch gekennzeich-  
net, daß man aus einer Proteinmischung einzelne Proteine, die  
ein Proteinfragment gemäß Anspruch 1 enthalten, über Anti-  
körper nachweist, die gegen das Proteinfragment gerichtet  
sind.
- 20 18. Verwendung eines Proteinfragments gemäß den Ansprüchen 1 bis  
6 oder eines Nukleinsäurefragments gemäß Anspruch 8 zur  
Reinigung von Proteinen.
- 25
- 30
- 35
- 40
- 45

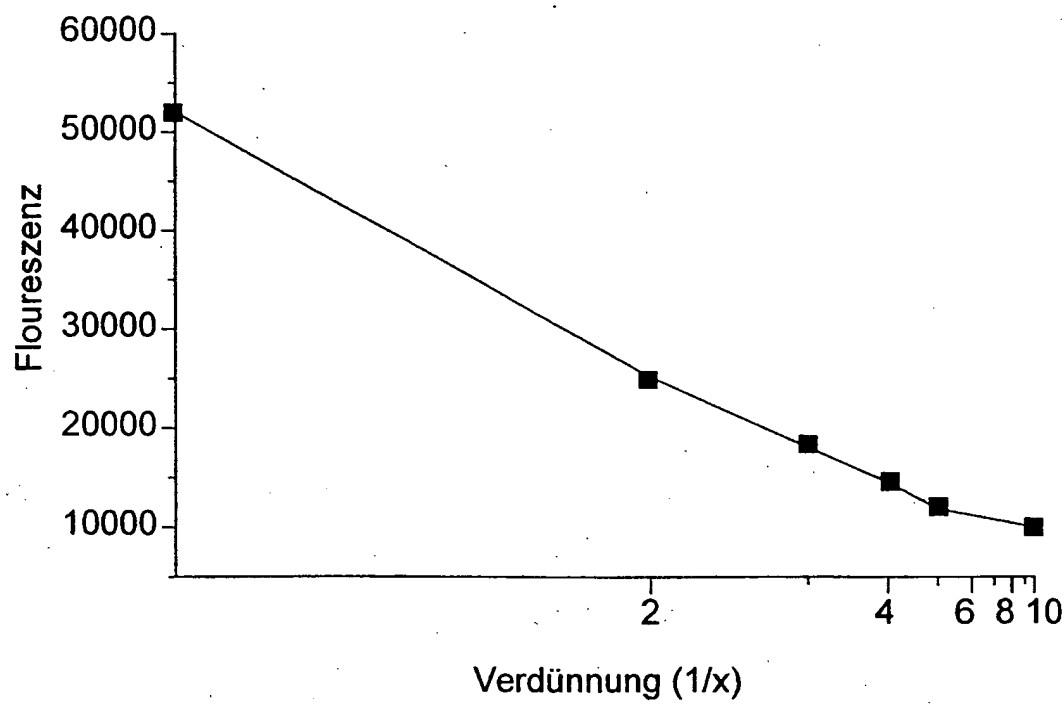
1/2

FIG.1



2/2

## FIG.2



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l

Application No

PCT/EP 99/03469

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N15/55 C12N15/62 C07K1/22 G01N33/53

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N C07K G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	VOLZ J ET AL: "Molecular characterization of metal -binding polypeptide domains by electrospray ionization mass spectrometry and metal chelate affinity chromatography." JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY. A, (1998 MAR 20) 800 (1) 29-37. , XP004112384 cited in the application the whole document ---	5-18
A	EP 0 282 042 A (HOFFMANN LA ROCHE) 14 September 1988 (1988-09-14) the whole document ---	5-18
A	EP 0 409 814 A (MONSANTO CO) 23 January 1991 (1991-01-23) the whole document ---	5-18
		-/-

 Further documents are listed in the continuation of box C. Patent family members are listed in annex.

## Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

13 October 1999

Date of mailing of the international search report

27/10/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Kania, T

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 99/03469

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MELCHERS K ET AL: "Cloning and membrane topology of a P type ATPase from <i>Helicobacter pylori</i> ." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, (1996 JAN 5) 271 (1) 446-57. , XP002118565 the whole document -----	5-18

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/EP 99/03469

**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2.  Claims Nos.: 1-4 because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

See supplemental sheet ADDITIONAL MATTER PCT/ISA/210

3.  Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

## ADDITIONAL MATTER PCT/ISA/210

## Field I.2 (continued)

## Claims nos: 1-4

The valid patent claims nos. 1-4 relate to a disproportionately large number of possible peptides. In fact, they relate to so many possible permutations and variables that they appear unclear under the terms of Article 6 of the PCT to such a degree that a meaningful search is impossible. The same applies to the products, uses and methods claimed in claims nos. 7-14, 17 and 18, insofar as these refer to claims nos. 1-4.

The valid patent claim no. 5 relates to a disproportionately large number of possible peptides of which only a small proportion can be supported by the description under the terms of Article 6 of the PCT and/or can be considered as being disclosed in the patent application under the terms of Article 5 of the PCT. In the case in question, the patent claims lack the corresponding support and the patent application lacks the corresponding disclosure to such a degree that a meaningful search with respect to the entire scope of protection sought seems impossible. The same applies to the products, uses and methods claimed in claims nos. 7-14 and 18, insofar as these refer to claim no. 5.

As a result, the search for claims nos. 5 and 7-18 was directed towards those parts of the patent claims which appear to be supported and disclosed in the above-mentioned sense, i.e. the parts relating to the compounds indicated in claim no. 6 and tables I and II in example 6.

The applicant is therefore reminded that claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established cannot normally be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1 (e) PCT). As a general rule, the EPO in its capacity as the authority entrusted with the task of carrying out an international preliminary examination will not conduct a preliminary examination for subjects in respect of which no search has been provided. This also applies to cases where the patent claims were amended after receipt of the international search report (Article 19 PCT) or to cases where the applicant provides new patent claims in keeping with the procedure mentioned in Chapter II of the PCT.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Inventor's name / Application No

PCT/cp 99/03469

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
EP 0282042 A	14-09-1988	AT	106897 T	15-06-1994
		AU	609783 B	09-05-1991
		AU	1270988 A	15-09-1988
		DE	3889949 D	14-07-1994
		DK	84288 A	11-09-1988
		IE	63991 B	28-06-1995
		JP	2686090 B	08-12-1997
		JP	63251095 A	18-10-1988
		NZ	223735 A	26-10-1990
		US	5310663 A	10-05-1994
		US	5284933 A	08-02-1994
		ZA	8801534 A	12-09-1988
EP 0409814 A	23-01-1991	US	5115102 A	19-05-1992
		AT	147433 T	15-01-1997
		CA	2021722 A	22-01-1991
		DE	69029615 D	20-02-1997
		DE	69029615 T	12-06-1997
		DK	409814 T	30-06-1997
		ES	2096584 T	16-03-1997
		GR	3023052 T	30-07-1997
		JP	3101693 A	26-04-1991

## INTERNATIONALE RECHERCHENBERICHT

Intrales Aktenzeichen  
PCT/EP 99/03469

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
IPK 6 C12N15/55 C12N15/62 C07K1/22 G01N33/53

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C12N C07K G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	VOLZ J ET AL: "Molecular characterization of metal -binding polypeptide domains by electrospray ionization mass spectrometry and metal chelate affinity chromatography." JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY. A, (1998 MAR 20) 800 (1) 29-37. , XP004112384 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument ---	5-18
A	EP 0 282 042 A (HOFFMANN LA ROCHE) 14. September 1988 (1988-09-14) das ganze Dokument ---	5-18
A	EP 0 409 814 A (MONSANTO CO) 23. Januar 1991 (1991-01-23) das ganze Dokument ---	5-18
		-/-



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

13. Oktober 1999

27/10/1999

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Kania, T

## INTERNATIONALE FORSCHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/03469

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	MELCHERS K ET AL: "Cloning and membrane topology of a P type ATPase from Helicobacter pylori." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, (1996 JAN 5) 271 (1) 446-57. , XP002118565 das ganze Dokument -----	5-18

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/03469

## Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1.  Ansprüche Nr. \_\_\_\_\_ weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
2.  Ansprüche Nr. 1-4 weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich  
Siehe Zusatzblatt WEITERE ANGABEN PCT/ISA/210
3.  Ansprüche Nr. \_\_\_\_\_ weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

## Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1.  Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2.  Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchengebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3.  Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr. \_\_\_\_\_.
4.  Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

### Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.  
 Die Zahlung zusätzlicher Recherchengebühren erfolgte ohne Widerspruch.

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

## Fortsetzung von Feld I.2

Ansprüche Nr.: 1-4

Die geltenden Patentansprüche 1-4 beziehen sich auf eine unverhältnismäßig große Zahl möglicher Peptide. In der Tat umfassen sie so viele mögliche Permutationen und Variablen, daß sie im Sinne von Art. 6 PCT in einem solchen Maße unklar erscheinen, als daß sie eine sinnvolle Recherche ermöglichen. Ebensolches gilt für die Produkte, Verwendungen und Verfahren, welche in Ansprüchen 7-14, 17, 18 beansprucht werden insoweit diese sich auf Ansprüche 1-4 rückbeziehen.

Der geltende Patentanspruch 5 bezieht sich auf eine unverhältnismäßig große Zahl möglicher Peptide, von denen sich nur ein kleiner Anteil im Sinne von Art. 6 PCT auf die Beschreibung stützt und/oder als im Sinne von Art. 5 PCT in der Patentanmeldung offenbart gelten kann. Im vorliegenden Fall fehlt den Patentansprüchen die entsprechende Stütze und fehlt der Patentanmeldung die nötige Offenbarung in einem solchen Maße, daß eine sinnvolle Recherche über den gesamten erstrebten Schutzbereich unmöglich erscheint. Ebensolches gilt für die Produkte, Verwendungen und Verfahren, welche in Ansprüchen 7-14, 18 beansprucht werden insoweit diese sich auf Anspruch 5 rückbeziehen.

Daher wurde die Recherche der Ansprüche 5, 7-18 auf die Teile der Patentansprüche gerichtet, welche im o.a. Sinne als gestützt und offenbart erscheinen, nämlich die Teile betreffend die Verbindungen wie angegeben in Anspruch 6 bzw. Tabellen I und II in Ausführungsbeispiel 6.

Der Anmelder wird darauf hingewiesen, daß Patentansprüche, oder Teile von Patentansprüchen, auf Erfindungen, für die kein internationaler Recherchenbericht erstellt wurde, normalerweise nicht Gegenstand einer internationalen vorläufigen Prüfung sein können (Regel 66.1(e) PCT). In seiner Eigenschaft als mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde wird das EPA also in der Regel keine vorläufige Prüfung für Gegenstände durchführen, zu denen keine Recherche vorliegt. Dies gilt auch für den Fall, daß die Patentansprüche nach Erhalt des internationalen Recherchenberichtes geändert wurden (Art. 19 PCT), oder für den Fall, daß der Anmelder im Zuge des Verfahrens gemäß Kapitel II PCT neue Patentanprüche vorlegt.

## INTERNATIONALER RECHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichung

zur selben Patentfamilie gehören

Aktenzeichen

PCT/EP 99/03469

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
EP 0282042 A	14-09-1988	AT	106897 T	15-06-1994
		AU	609783 B	09-05-1991
		AU	1270988 A	15-09-1988
		DE	3889949 D	14-07-1994
		DK	84288 A	11-09-1988
		IE	63991 B	28-06-1995
		JP	2686090 B	08-12-1997
		JP	63251095 A	18-10-1988
		NZ	223735 A	26-10-1990
		US	5310663 A	10-05-1994
		US	5284933 A	08-02-1994
		ZA	8801534 A	12-09-1988
EP 0409814 A	23-01-1991	US	5115102 A	19-05-1992
		AT	147433 T	15-01-1997
		CA	2021722 A	22-01-1991
		DE	69029615 D	20-02-1997
		DE	69029615 T	12-06-1997
		DK	409814 T	30-06-1997
		ES	2096584 T	16-03-1997
		GR	3023052 T	30-07-1997
		JP	3101693 A	26-04-1991